

Aus dem European Center for Angioscience (ECAS)
der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
Sektion Kardiovaskuläre Physiologie
(Leiter: Prof. Dr. med. Jörg Heineke)

Die Beteiligung von Kaliumkanälen an der durch
Natrium-Nitroprussid induzierten Gefäßrelaxation

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Peter Reinhold Winkler

aus
Heppenheim
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Rudolf Schubert

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Herz-Kreislauf-System	2
1.1.1 Aufbau der Arterien	3
1.2 Glatte Gefäßmuskulatur	5
1.2.1 Kontraktionsmechanismen der glatten Muskelzelle	6
1.2.2 Relaxationsmechanismen der glatten Muskelzelle	9
1.3 Membranpotential.....	10
1.4 Kaliumkanäle der glatten Gefäßmuskulatur	12
1.4.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V).....	12
1.4.2 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}).....	15
1.4.3 Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})	17
1.4.4 ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}).....	19
1.4.5 Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle (K_2P)	20
1.5 Pharmakologie und Wirkmechanismen von Natrium-Nitroprussid (SNP)...	21
1.6 Fragestellung und Zielsetzung	22
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 Versuchstiere	25
2.2 Verwendete Materialien und Geräte.....	25
2.2.1 Versuchslösungen	25
2.2.2 Reagenzien	28
2.2.3 Geräte und Laborhilfsmittel.....	29
2.2.4 Software	30
2.2.5 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.3 Isometrische Myographie	31
2.3.1 Gefäßpräparation	33
2.3.2 Fixierung der Arteriensegmente in der Messkammer	34

2.3.3	Normalisierung und Vitalitätstestung	35
2.4	Versuchsprotokolle	37
2.5	Datenanalyse und Statistik	43
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Antikontraktiler Effekt von Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle	44
3.2	Funktionelle Rolle des Kir ₆ -Kanals	46
3.3	Funktionelle Rolle des Kir ₂ -Kanals	48
3.4	Funktionelle Rolle des Kv ₁ -Kanals	49
3.5	Funktionelle Rolle des Kv ₂ -Kanals	51
3.6	Funktionelle Rolle des Kv ₇ -Kanals	52
3.7	Funktionelle Rolle des BK _{Ca} -Kanals	54
3.8	Antikontraktiler Effekt von 10 ⁻⁸ M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von Kv ₇ -Kanälen.....	55
3.9	Antikontraktiler Effekt von 10 ⁻⁷ M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von Kv ₇ -Kanälen.....	56
3.10	Antikontraktiler Effekt von 10 ⁻⁸ M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von Kv ₇ - und BK _{Ca} -Kanälen.....	57
3.11	Antikontraktiler Effekt von 10 ⁻⁷ M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von Kv ₇ - und BK _{Ca} -Kanälen.....	59
3.12	Antikontraktiler Effekt von 10 ⁻⁸ M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von BK _{Ca} -Kanälen	60
3.13	Antikontraktiler Effekt von 10 ⁻⁷ M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von BK _{Ca} -Kanälen	61
4	DISKUSSION	62
4.1	Kritische Methodenbetrachtung und Limitationen dieser Studie.....	62
4.2	Antikontraktiler Effekt von Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle	64
4.2.1	Funktionelle Rolle des Kir ₆ -Kanals.....	66
4.2.2	Funktionelle Rolle des Kir ₂ -Kanals.....	68
4.2.3	Funktionelle Rolle des Kv ₁ -Kanals.....	70
4.2.4	Funktionelle Rolle des Kv ₂ -Kanals.....	72
4.2.5	Funktionelle Rolle des Kv ₇ -Kanals.....	74
4.2.6	Funktionelle Rolle des BK _{Ca} -Kanals	78

4.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	83
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	86
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	88
7	LEBENS LAUF	107
8	DANKSAGUNG.....	108

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Ca ²⁺] _{in}	Intrazelluläre Calciumkonzentration
AC	Adenylatzyklase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AVE1231	2-(butylsulfonylamino)-N-[(1R)-1-(6-methoxypyridin-3-yl)propyl]benzamide
BaCl ₂	Bariumchlorid
BK _{Ca}	Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
DPO-1	Diphenyl phosphine oxide-1
DWK	Konzentrations-Wirkungsbeziehung
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GLI	Glibenclamid
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IBTX	Iberiotoxin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
K ₂ P	Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle
K _{ATP}	ATP-sensitive Kaliumkanäle
KCl	Kaliumchlorid
K _v	spannungsabhängige Kaliumkanäle
MLCK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase
MP	Membranpotential
NO	Stickstoffmonoxid
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
RP	Ruhemembranpotential
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SNP	Natrium-Nitroprussid
STX	Stromatoxin
TRPC-Kanal	Transient receptor potential canonical Kanal
VOC	spannungsabhängiger Calciumkanal vom L-Typ
XE991	10,10-bis(4-Pyridinyl-methyl)-9(10H)-anthracenonedihydrochlorid

1 EINLEITUNG

1.1 Herz-Kreislauf-System

Die arteriellen und venösen Blutgefäße bilden in ihrer Gesamtheit ein geschlossenes Röhrensystem, in dem das vom Herzen angetriebene Blut unidirektional fließt. Der linke Ventrikel wirft das Blut in den großen Kreislauf aus. Die großen herznahen Arterien zweigen sich in Ihrem Verlauf immer weiter auf bis schließlich in der Peripherie die verschiedensten Gewebe zum Stoff- und Gasaustausch erreicht werden.

Über das venöse System erfolgt der Rückfluss des Blutes aus der Peripherie zum rechten Herzen. Diesem nachgeschaltet ist der Gasaustausch in der Lunge. Schließlich wird erneut das linke Herz erreicht und der Blutkreislauf beginnt erneut.

In seiner Gesamtheit stellt das Herz-Kreislauf-System das zentrale Transportsystem des Organismus dar, welches sämtliche Organe bedarfsorientiert versorgt und somit normalerweise den elementaren Stoffwechselbedarf jeder einzelnen Zelle deckt.

Hierzu erfolgt die Zufuhr von Sauerstoff sowie diverser Substrate für den Energiestoffwechsel. Gleichzeitig erfolgt die Abfuhr von Stoffwechselendprodukten, Kohlenstoffdioxid (CO₂) sowie der aus den Stoffwechselprozessen entstandenen Wärme. Die Feinregulation des Stoffwechsels erfolgt hierbei über die Verteilung von molekularen Signalstoffen und Enzymen (Kummer und Welsch, 2014). Ebenso ist das Herz-Kreislauf-System in die Thermoregulation sowie die Blutstillung involviert.

Der Transport der zuvor beschriebenen Substanzen erfolgt mit der Blutströmung durch das Röhrensystem und wird als Konvektion bezeichnet. Das Blut fließt entlang eines Druckgradienten (Perfusionsdruck) durch das Gefäßsystem. Treibende Kraft ist das Herz, welches als muskuläres Hohlorgan durch seine Pumpfunktion einen Druckgradienten von ca. 100 mmHg zwischen Aorta und den großen herznahen Venen erzeugt (Rettig und Kuschinsky, 2013).

In der Peripherie wird dieser Perfusionsdruck durch kleine Arterien und Arteriolen, die Widerstandsgefäße der Organe, gedrosselt. Über diese regionalen Strömungswiderstände erfolgt die bedarfsgerechte Verteilung des Herzzeitvolumens. Die glatte

Gefäßmuskulatur und ihr Kontraktionsverhalten sind hierfür von essenzieller Bedeutung (Guyton, 1981).

Der eigentliche Stoffaustausch zwischen Blut und den Endorganen bzw. Geweben findet im Bereich der Kapillaren und postkapillären Venolen statt.

1.1.1 Aufbau der Arterien

Die arterielle Gefäßwand zeigt wie die meisten Gefäße des Herz-Kreislauf-Systems histologisch einen dreischichtigen Wandaufbau (Abb. 1) (Borysenko und Beringer, 1984; Pugsley und Tabrizchi, 2000).

Die Grenzfläche zum Blut wird von der Tunica intima (Intima) gebildet. Diese innerste und dünnste Schicht besteht aus einschichtigem Endothel, welches einer dünnen Bindegewebeschicht aufsitzt, die ihr Flexibilität aber auch Stabilität verleiht. Neben einer Barrierefunktion nimmt diese Schicht Einfluss auf die lokale Blutgerinnung wie auch Thrombolysen, beeinflusst den vaskulären Tonus durch Interaktion mit den glatten Muskelzellen und reguliert in den Kapillaren auf Basis einer selektiven Permeabilität der Endothelzellen sowohl den Stoff- als auch Gasaustausch zwischen dem intra- und extravasalen Raum. Sie ist ebenso in Entzündungs- wie auch immunologische Prozesse eingebunden (Pugsley und Tabrizchi, 2000).

Mit der Membrana elastica interna schließt sich eine kräftige Lamelle elastischer Fasern an, der Lagen ringförmig angeordneter glatter Gefäßmuskelzellen folgen. Diese Muskelschicht wird als Tunica media (Media) bezeichnet. In Abhängigkeit vom Typ und Lokalisation der Arterien befinden sich die glatten Gefäßmuskelzellen in einer Matrix aus elastischen und zirkulären Fasern und die Anzahl an Muskelschichten variiert stark (Kummer und Welsch, 2014; Pugsley und Tabrizchi, 2000).

Die glatten Muskelzellen sind autonom neural innerviert und werden von vasoaktiven Hormonen, Autakoiden und von mechanischer Krafteinwirkung beeinflusst (Webb, 2003). Der aus diesen Einflüssen resultierende Gefäßtonus bestimmt den peripheren Gefäßwiderstand und stellt den wichtigsten Regulationsmechanismus des Kreislaufsystems dar (Guyton, 1981).

Einer erneuten Schicht strukturell unterstützender elastischer Fasern, der Membrana elastica externa, folgt die äußerste Begrenzung der Arterienwand. Diese wird von der Tunica externa (Adventitia) gebildet. Diese Schicht besteht aus elastischen Fasern und kräftigen Kollagenfasern. Sie verankert die Blutgefäße im umgebenden Bindegewebe und enthält, vor allem bei Arteriolen, sensorische und vegetative Nervenfasern zur Regulation des vaskulären Tonus.

Größere Arterien enthalten zudem zur eigenen Sauer- und Nährstoffversorgung eigene kleine Blutgefäße, die Vasa vasorum (Kummer und Welsch, 2014; Pugsley und Tabrizchi, 2000). Kleinere Gefäße werden hingegen mittels Diffusion versorgt.

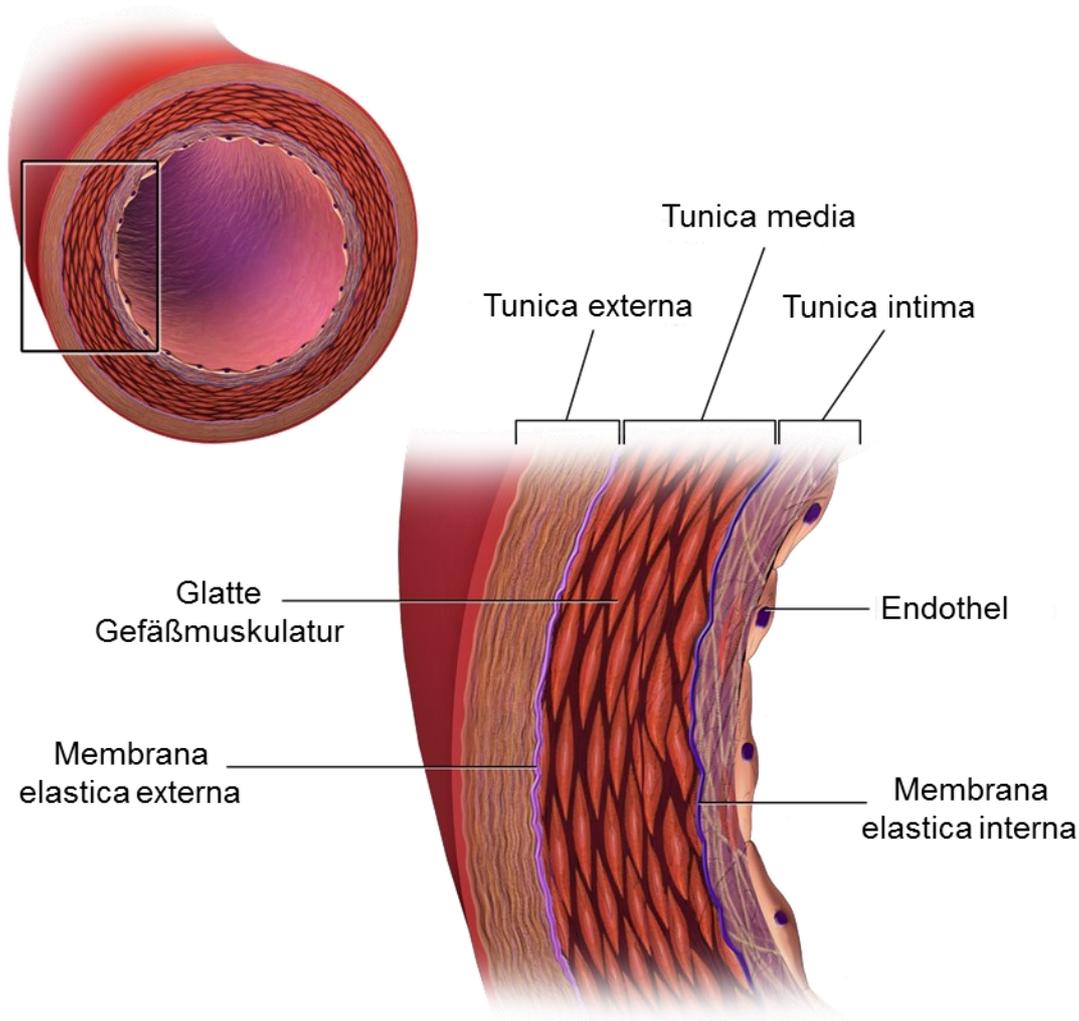


Abbildung 1: Aufbau Arterienwand (modifiziert nach https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c8/Blausen_0055_ArteryWallStructure.png/600px-Blausen_0055_ArteryWallStructure.png, letzter Zugriff 16.08.2022 um 16:45 Uhr)

Zur Bewegung größerer Blutvolumina sind die Aorta und die großen herznahen Arterien vom elastischen Typus speziell organisiert. Sie weisen in ihrer Tunica media neben glatten Gefäßmuskelzellen ein komplexes System aus elastischen Lamellen und Fasern auf.

In ihrer Gesamtheit bilden diese Gefäße einen physiologischen Windkessel aus, der den diskontinuierlichen Blutausschuss des linken Ventrikels in der Systole durch eine temporäre Dehnung der Gefäßwände und Abgabe des gespeicherten Volumens in der Diastole in eine homogenere Strömung umwandelt (Pugsley und Tabrizchi, 2000; Rettig und Kuschinsky, 2013).

Die kleinen Arterien vom muskulären Typus sind im Herz-Kreislauf-System deutlich häufiger vertreten. Sie sind organnah lokalisiert und bestehen aus zahlreichen Schichten dicht gepackter und überwiegend konzentrisch angeordneter glatter Gefäßmuskulatur. Ihr Wandaufbau zeigt sich sehr variabel, repräsentiert die lokalen physiologischen Besonderheiten und korreliert mit dem Blutdruck. Zusammen mit den Arteriolen nehmen sie als Widerstandsgefäße Einfluss auf die Verteilung des Herzzeitvolumens und regulieren über Vasokonstriktion und -dilatation die Durchblutung des nachgeschalteten Gefäßgebiets (Pugsley und Tabrizchi, 2000; Rettig und Kuschinsky, 2013). Der vaskuläre Tonus wird hierbei über die Kontraktion und Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen reguliert.

1.2 Glatte Gefäßmuskulatur

Die glatte Gefäßmuskulatur der Tunica media stellt die kontraktile Komponente der Blutgefäße dar und besteht aus Schichten und Bündeln zirkulär angeordneter glatter Muskelzellen, welche in einer Matrix aus dehnbaren elastischen Fasern und wenig dehnbaren kollagenen Fasern eingebettet sind (Pfitzer und Hescheler, 2013). Innerviert wird die Gefäßmuskulatur von vegetativen Nervenfasern. Sie reagiert zudem auf mechanische Reize, Neurotransmitter und vasoaktive Gewebshormone (Webb, 2003). Die glatte Gefäßmuskulatur vermittelt relativ träge Kontraktionen, ermüdet hierbei jedoch nur langsam, so dass ein Muskeltonus über lange Zeit konstant aufrechterhalten werden kann.

Elektronenmikroskopisch zeigen sich die einzelnen Muskelzellen homogen, ohne markante Querstreifung mit zentral gelegenem Zellkern. Das Zytoskelett besteht aus den beiden Intermediärfilamenten Desmin und Vimentin. Die Vernetzung erfolgt über Dense Bodies und Dense Bands. Über Letztere erfolgt zugleich die mechanische Verknüpfung der glatten Muskelzellen untereinander (Pfitzer und Hescheler, 2013; Welsch und Deller, 2014).

Die Mikrosakromere des kontraktile Apparates bestehen aus dicken und dünnen Proteinfilamenten. Ihre Verteilung im Zytoplasma variiert. Komplexe aus Aktin mit den angelagerten Regulatorproteinen Caldesmon, Calponin und Tropomyosin werden den dünnen Proteinfilamenten zugeordnet. Diese inserieren am Zytoskelett. Die dicken Proteinfilamente werden von Myosin II gebildet. Dieses setzt sich aus zwei identischen schweren Ketten zusammen, welche jeweils mit Myosinköpfchen enden. An diesen

Köpfchen bindet je eine regulatorische und eine katalytische leichte Kette (Pfitzer und Hescheler, 2013). Ebenso sind sie Bindungsstelle der Aktinfilamente für die Interaktion zwischen den Myofilamenten. Das Verhältnis zwischen Aktin- zu Myosinfilamenten beträgt circa 18:1 (Bülbring et al., 1981). Das für die Kontraktion essenzielle Calcium wird im Zytoplasma im sarkoplasmatischen Retikulum gespeichert. Die Freisetzung erfolgt als Antwort auf die Einwirkung von Neurotransmittern, Gewebshormonen sowie Dehnung der glatten Muskelzellen.

Es werden zwei Funktions- bzw. Erregungstypen glattmuskulärer Zellverbände unterschieden:

Beim Single-Unit-Typ ist der Zellverband bestehend aus vielen Einzelzellen mittels vieler Gap Junctions elektrisch gekoppelt und kontrahiert daher als funktionelle Einheit. Dieses funktionelle Synzytium wird vor allem über Schrittmacherzellen erregt. Die daraus resultierende Kontraktionskraft wird durch das vegetative Nervensystem moduliert (Pfitzer und Hescheler, 2013).

Beim Multi-Unit-Typ erfolgt eine direkte Innervation mehrerer Kontraktionseinheiten über einen vegetativen Nerv des autonomen Nervensystems – die Einzelzellen des Zellverbands sind elektrisch weitestgehend voneinander getrennt. Bei diesem Typus sind Kontraktionen auch nur einzelner Zellen möglich.

Die glatte Gefäßmuskulatur zeigt in ihrer Gesamtheit eine Mischung dieser beiden Typen. Die Ausprägung der vegetativen Innervationsdichte und der elektrischen Kopplung variiert stark und spiegelt sich in einem organtypischen Kontraktionsmuster wider (Kummer und Welsch, 2014).

1.2.1 Kontraktionsmechanismen der glatten Muskelzelle

Die Aktivierung von glatten Gefäßmuskelzellen stellt einen komplexen Prozess von Signalkaskaden dar. Sie beruht einerseits auf der Depolarisation der Zellmembran durch mechanische Dehnung, Druck oder durch Schrittmacherzellen, wird ebenso durch Neurotransmitter wie Acetylcholin, Noradrenalin oder auch auto- bzw. parakrin durch Gewebshormone wie Serotonin und Histamin vermittelt (Webb, 2003; Welsch und Deller, 2014). Am Ende dieser vielzähligen Regulationsmechanismen steht in der Regel die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mit konsekutivem Ablauf des Querbrückenzyklus.

Die Kontraktion wird hierbei durch die Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente der Mikrosakromere vermittelt und energetisch durch die katalytische Aktivität der Myosin-ATPase unterhalten (Webb, 2003).

Die Depolarisation induziert die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle vorwiegend vom L-Typ der glattmuskulären Zellemembran (Martinsen et al., 2014). Konzentrationsabhängig erfolgt ein Einstrom von Calciumionen in die glatte Gefäßmuskelzelle (Khalil et al., 1987). Dieser intrazelluläre Konzentrationsanstieg von Calcium triggert nachfolgend die calciumabhängige Freisetzung von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in dem die Bindung an Ryanodinrezeptoren erfolgt. Ryanodinrezeptoren sind ihrerseits calciumaktivierbare Calciumkanäle in den Wänden des sarkoplasmatischen Retikulums. Neben einem Sensor für Calcium enthalten sie zur Regulation diverse Bindungsstellen für interagierende Moleküle und können zudem über Phosphorylierungen reguliert werden (Tykocki et al., 2017a; Webb, 2003).

Jeweils vier Calciumionen binden im Zytoplasma an das Protein Calmodulin. Über eine Konformationsänderung entsteht der regulatorische Calcium-Calmodulin-Komplex. Dieser bindet bei hoher intrazellulärer Calciumkonzentration an den Ryanodinrezeptor und inhibiert diesen. Im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus wird somit die weitere Freisetzung von Calcium gedrosselt (Tykocki et al., 2017a).

Ebenso erfolgt die Interaktion des Calcium-Calmodulin-Komplexes mit dem Protein Caldesmon, welches seinerseits Teil des regulatorischen Tropomyosin-Caldesmon-Komplexes ist. Dieser Komplex ist am Aktinfilament angelagert, blockiert dort die Myosinbindungsstelle und hemmt außerdem die katalytische Aktivität der Myosin-ATPase.

Durch die Interaktion zwischen diesen regulatorischen Komplexen wird die Bindungsstelle freigelegt und die katalytische Aktivität in den Myosinköpfchen enthemmt. Für das Letztgenannte aktiviert der Calcium-Calmodulin-Komplex das Enzym Myosin-Leichte-Ketten-Kinase mit konsekutiver Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins, wodurch die Interaktion zwischen den Myofilamenten Aktin und Myosin – der Querbrückenzyklus – ermöglicht wird (Pfitzer und Hescheler, 2013; Webb, 2003).

Neben dieser elektromechanischen Ankopplung ist auch eine pharmakomechanische Ankopplung möglich, die ihrerseits eine calciumabhängige Kontraktion auslöst. Sie

zeigt sich unabhängig vom anliegenden Membranpotential und basiert auf einer Liganden-vermittelten Aktivierung von membranständigen Calciumkanälen. Daneben bestehen auch calciumunabhängige Signalwege mit kontraktionsfördernder Wirkung.

Nach Aktivierung der rezeptorabhängigen Kanäle, direkt oder über G-Proteine vermittelt, erfolgt ein konzentrationsabhängiger Einstrom von Calcium in das Zellinnere. Dieser Anstieg induziert die zuvor beschriebenen Signalkaskaden und initiiert ebenfalls den Querbrückenzyklus (Khalil et al., 1987; Webb, 2003).

Die endogenen Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sowie das exogene Katecholamin Methoxamin binden hochselektiv und mit großer Affinität an den membranständigen α 1-Adrenorezeptoren. Die Liganden Angiotensin II und Endothelin binden ebenso an membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

G-Protein-vermittelt wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche das Membranphospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die beiden Spaltprodukte Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Der aus dieser Hydrolyse hervorgehende Second Messenger Inositoltrisphosphat (IP_3) bindet an seinen zugehörigen Rezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums, welcher als Calciumkanal wiederum Calcium nach intrazellulär freisetzt.

Der gleichermaßen entstandene Second Messenger Diacylglycerol aktiviert in Zusammenspiel mit Calcium die Proteinkinase C (PKC), die ihrerseits über die Phosphorylierung der kontraktionshemmenden Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) sowie der Calciumkanäle vom L-Typ kontraktionsfördernd wirkt. Zudem werden ligandengesteuerte Kationenkanäle (TRPC-Kanal) in der Zellmembran der glatten Muskelzelle geöffnet (Tykocki et al., 2017a; Webb, 2003).

Der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur steht in direkter Abhängigkeit zum Grad der Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette der Myosinfilamente und wird über zwei Enzyme reguliert (Webb, 2003):

Während die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) die Calcium-Sensitivität des kontraktile Apparats reguliert und durch die Phosphorylierung der leichten Myosinkette den Querbrückenzyklus und damit die Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzelle aktiviert, ist die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) als Antagonist via Dephosphorylierung an der Relaxation der glatten Muskulatur beteiligt. Entsprechend wirkt eine Inhibierung Letzterer kontraktionsfördernd.

Dies ist neben der Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) - nach Aktivierung durch Calcium und Diacylglycerol (DAG) - auch calciumunabhängig durch Bindung von Liganden (z.B. Angiotensin II) an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren möglich. Das G-Protein RhoA aktiviert die Rho-Kinase, in dessen Folge wird die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) calciumunabhängig phosphoryliert. Eine Bindung an die leichte Kette des Myosins und damit deren Dephosphorylierung wird verhindert und in Folge dessen wird indirekt die Kontraktion gefördert (Webb, 2003).

Am Ende der elektromechanischen sowie der calciumabhängigen und -unabhängigen pharmakomechanischen Signalkaskaden steht immer der Querbrückenzyklus als eigentlicher Mechanismus der Kraftentwicklung der glatten Gefäßmuskulatur.

Die Kontraktion resultiert aus dem Vorübergleiten der Aktin- und Myosinfilamente mit konsekutiv zunehmender Überlappung der Myofilamente und entsprechender Verkürzung der glatten Muskelzellen. Dieser Vorgang basiert auf der zyklischen Ausbildung von Querbrücken zwischen den aktivierten Myosinköpfchen und ihren benachbarten Aktinfilamenten.

Energetisch wird der Querbrückenzyklus durch die Aktivität der Myosin-ATPase unterhalten (Pfitzer und Hescheler, 2013; Webb, 2003).

1.2.2 Relaxationsmechanismen der glatten Muskelzelle

Die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur kann wie die Kontraktion über verschiedene Signalwege initiiert werden und basiert neben der Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration vor allem auf der Aktivitätssteigerung der antikontraktilen Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (Webb, 2003).

Liganden wie Noradrenalin (β_2 -Adenorezeptoren) oder Prostaglandine und Histamin aktivieren über G-Protein gekoppelte Rezeptoren membranständige Adenylatzyklen (AC), welche intrazellulär die Synthese von cyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) katalysieren.

Endothelial freigesetzte Stickstoffmonoxidmoleküle (NO) (z.B. durch intravasale Scherkräfte) stimulieren die lösliche Guanylatzyklase (sGC) zur Synthese von cyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) (Freed und Gutterman, 2017).

Der Anstieg dieser zyklischen Nukleotide steigert die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) sowie Proteinkinase G (PKG).

Hierdurch erfolgt die Phosphorylierung und damit Hemmung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK). Die Aktivität der antagonistisch arbeitenden Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) wird hingegen gesteigert.

Daneben wird der Rho-Kinase-Signalweg sowie die Inositoltrisphosphat-gesteuerte Calciumfreisetzung gehemmt und zusätzlich nimmt die Sensitivität des kontraktile Apparates gegenüber Calcium ab (Freed und Gutterman, 2017; Webb, 2003).

Über den Anstieg der zyklischen Nukleotide wird ebenso die Aktivität von Natrium-Calcium-Austauschern sowie ATP-abhängigen Calciumpumpen der Zellmembran wie auch des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) gesteigert und in Folge des gesteigerten Ausstroms die intrazelluläre Konzentration des für die Kontraktion essenziellen Calciums vermindert (Furukawa et al., 1991; Webb, 2003).

Über die Proteinkinasen werden zudem Kaliumkanäle der glattmuskulären Zellmembran, wie der calcium-aktivierte (BK_{Ca}), der einwärts gleichrichtende (K_{ir}) sowie der ATP-abhängige Kaliumkanal (K_{ATP}), aktiviert.

Die aus dem vermehrten Ausstrom von positiv geladenen Kaliumionen entstehende Hyperpolarisation der Zellmembran hemmt spannungsabhängige Calciumkanäle. Dies fördert ebenso die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Freed und Gutterman, 2017; Khalil et al., 1987; Schubert und Nelson, 2001).

1.3 Membranpotential

Das Ruhemembranpotential (RP) der glatten Gefäßmuskelzellen beträgt in vivo zwischen -40 und -55 mV (Daut et al., 1994b; Nelson und Quayle, 1995) und beruht auf der selektiven Permeabilität der Zellmembran für Kalium, Chlorid sowie Calcium und wird ebenso durch den elektrochemischen Gradienten dieser Ionen beeinflusst. Grundlage hierfür sind vier Arten von Ionenkanälen in der Plasmamembran der glatten Gefäßmuskelzellen. Man unterscheidet zwischen Chlorid-, nicht-selektiven Kationen-, spannungsabhängigen Calcium- sowie Kalium-Kanälen (Jackson, 2000; Nelson und Quayle, 1995).

Auf Grund der ausgeprägten Leitfähigkeit der Zellmembran für Kalium bestimmt dieses positiv geladene Ion maßgeblich das Ruhemembranpotential (Hirst und Edwards, 1989) und in dessen Folge die Erregbarkeit der Gefäßmuskelzellen.

Eine Erhöhung der Leitfähigkeit führt zu einem Ausstrom der Kaliumionen aus dem Zellinneren. Dies bedingt eine Hyperpolarisation des Ruhemembranpotentials – das Membranpotential nimmt negativere Werte an (Abb. 2).

Eine Blockade der Kaliumkanäle reduziert hingegen diesen Ausstrom positiver Ladung aus dem Zellinneren und führt so zu einer Depolarisation. Das Ruhemembranpotential nimmt positivere Werte an (Nelson und Quayle, 1995), die Zelle wird erregt (Abb. 2).

Diese Erregung kann zur Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle führen mit hieraus folgender Verschiebung von kontraktionsförderndem Calcium aus dem Extra- in den Intrazellulärraum – es resultiert eine Kontraktion der glatten Gefäß-muskelzelle (Abb. 2) (Daut et al., 1994b; Jackson, 2000; Nelson und Quayle, 1995; Thorneloe und Nelson, 2005).

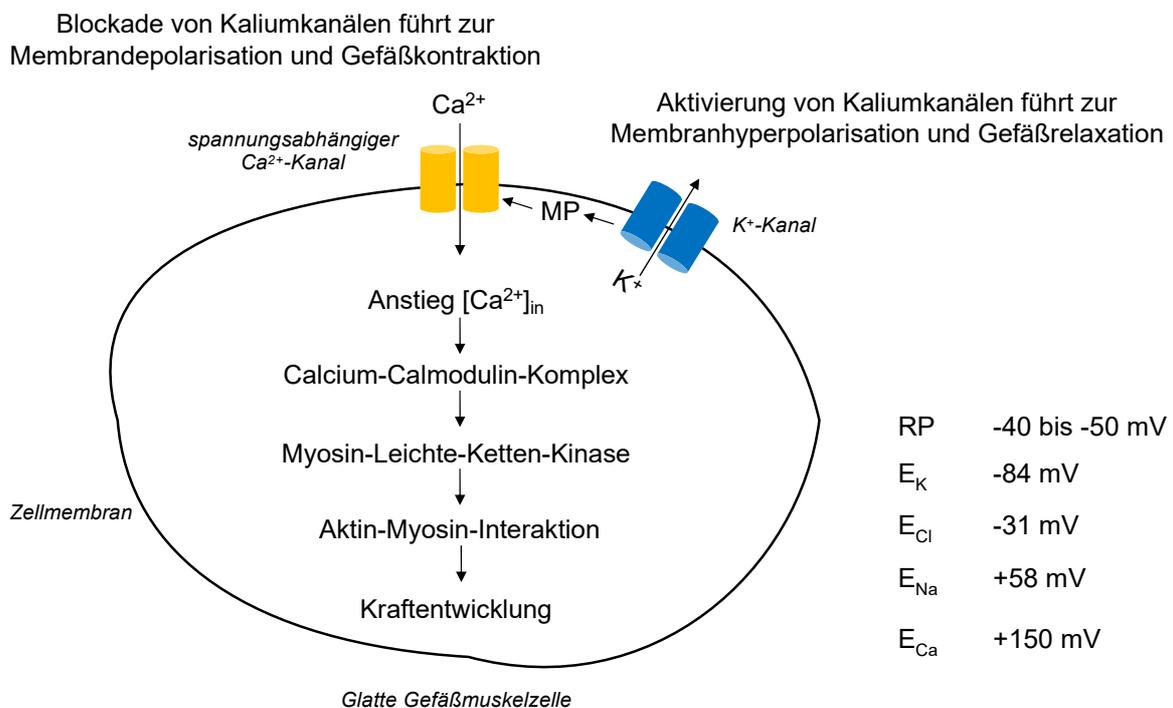


Abbildung 2: Membranpotential bei der Regulation des Tonus arterieller glatter Muskulatur – Einfluss der Blockade bzw. Aktivierung von Kaliumkanälen (Eigene Darstellung in Anlehnung an Nelson und Quale, 1995) [Ca²⁺]_{in}=intrazelluläre Calciumkonzentration; MP=Membranpotential [mV]; RP=Ruhemembranpotential glatter Gefäßmuskelzellen; E_K=Gleichgewichtspotential Kalium; E_{Cl}= Gleichgewichtspotential Chlorid; E_{Na}=Gleichgewichtspotential Natrium; E_{Ca}=Gleichgewichtspotential Calcium)

Zusammenfassend nehmen kaliumselektive Ionenkanäle über ihren Einfluss auf das Membranpotential eine zentrale Rolle bei der Regulation des peripheren Widerstands und der daraus resultierenden Regulation der Organdurchblutung ein (Thorneloe und Nelson, 2005). Bereits geringste Veränderungen des Membranpotentials bedingen deutliche Veränderung der Gefäßdurchmesser (Daut et al., 1994b).

1.4 Kaliumkanäle der glatten Gefäßmuskulatur

In der glatten Gefäßmuskulatur werden hauptsächlich vier verschiedene Arten von kaliumselektiven Ionenkanälen exprimiert.

Man unterscheidet zwischen spannungsabhängigen (K_v), Calcium-aktivierten (K_{Ca}), einwärts gleichrichtenden (K_{ir}) sowie ATP-abhängigen (K_{ATP}) Kaliumkanälen. Zahlenmäßig am stärksten sind hierbei die spannungs-abhängigen Kaliumkanäle (K_v) sowie die Calcium-aktivierten Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}) vertreten (Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a). Eine weitere und recht neu untersuchte Familie von Kaliumkanälen wird durch die Zweiporen-Domänen (K_2P) Kaliumkanäle gebildet (Goldstein et al., 2001).

Die Aktivität der unterschiedlichen Kaliumkanäle ist von enormer Bedeutung für den Erhalt aber auch für die Modulation des Membranpotentials der glatten Gefäßmuskulaturzellen.

Die Öffnung der Ionenkanäle induziert entsprechend dem elektrochemischen Gradienten für Kalium einen Ausstrom dieser Kationen. Positive Ladungsträger verlassen das Zytoplasma. Dies führt zur Hyperpolarisation der Zellmembran und konsekutiv zur Vasodilatation.

Dementsprechend verhindert eine Blockade der Ionenkanäle den Ausstrom der positiv geladenen Ionen. Dies begünstigt die Depolarisation der Zellmembran und trägt zur Vasokonstriktion bei (Jackson, 2000; Nelson und Quayle, 1995).

Bereits geringe Potentialveränderungen des Ruhemembranpotentials (RP) führen zu einer deutlichen Veränderung des arteriellen Gefäßtonus. Dies verdeutlicht, dass sowohl Aktivierung als auch Deaktivierung von Kaliumkanälen einen wichtigen Mechanismus der Durchblutungsregulation darstellen (Brayden und Nelson, 1992; Nelson und Quayle, 1995).

1.4.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v)

Insgesamt sind 12 verschiedene Familien spannungsabhängiger Kaliumkanäle bekannt. Unter ihnen besteht eine enorme Diversität. Unterschieden werden Kaliumkanäle anhand ihrer Leitfähigkeit für Kaliumionen, der Spannungsabhängigkeit, der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanalpore, der pharmakologischen Eigenschaften sowie ihrer Expression in unterschiedlichen Geweben bzw. Gefäßen.

In der glatten Gefäßmuskulatur sind vor allem Kv_1 -, Kv_2 - sowie Kv_7 (KCNQ)-Kanäle von besonderer Relevanz (Jackson, 2018; Tykocki et al., 2017a).

Spannungsabhängige Kaliumkanäle werden hauptsächlich durch die Depolarisation der Zellmembran aktiviert (Abb. 3). Hierbei besteht eine positive Korrelation zwischen der Depolarisation und der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kaliumkanäle. Die mit der Depolarisation einhergehende Veränderung des elektrochemischen Gradienten für Kalium trägt zu einem erweiterten Ausstrom von Kalium aus dem Zellinneren bei.

Die Depolarisation der Zellmembran führt nicht nur zur Aktivierung der Kanäle, sondern auch zu einer zeitversetzten Inaktivierung dieser. Diese verläuft jedoch deutlich langsamer, sodass zwischenzeitlich eine Hyperpolarisation der Zellmembran auftritt (Nelson und Quayle, 1995).

Durch die Aktivierung der spannungsabhängigen Kanäle erfolgt zusammenfassend eine Limitation depolarisierender Stimulationen im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus. Ebenso wird die Repolarisation des Membranpotentials unterstützt und das Ruhemembranpotential stabilisiert.

Die induzierte Hyperpolarisation verhindert die Aktivierung bzw. das Öffnen spannungsabhängiger Calciumkanäle in der Zellmembran und in dessen Folge werden bei erniedrigten intrazellulären Calciumkonzentrationen die glattmuskulären Kontraktionsmechanismen gehemmt – man kann sie als Antagonisten des myogenen Tonus werten (Jackson, 2000, 2018; Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a). Neben der Depolarisation können Kv -Kanäle auch über verschiedene Vasodilatoren sowie Signalmoleküle wie Stickstoffmonoxid (NO), Schwefelwasserstoff (H_2S) wie auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) aktiviert werden (Abb. 3).

Nach Bindung diverser Vasodilatoren (bspw. Adenosin) an G_s -gekoppelte Rezeptoren der Zellmembran erfolgt die intrazelluläre Stimulation der Adenylatzyklase mit konsekutiver Steigerung der cAMP-Produktion. Endotheliales oder exogen zugeführtes Stickstoffmonoxid (NO) steigert die intrazelluläre Produktion von cGMP über Stimulation der löslichen Guanylatzyklase. Die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP steigern über die dazugehörigen Proteinkinasen A und G die Phosphorylierung der Kv -Kanäle, in dessen Folge nach extrazellulär gerichtete Kaliumströme vergrößert werden (Dick und Tune, 2010; Stott et al., 2015; Stott und Greenwood, 2015; Tanaka et al., 2006; Tykocki et al., 2017a).

Daneben sind auch endothelial freigesetzter Schwefelwasserstoff (H_2S) wie auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in der Lage, spannungsabhängige Kaliumkanäle zu aktivieren und eine Hyperpolarisation zu induzieren, die durch den Schluss spannungsabhängiger Calciumkanäle über einen Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration den kontraktilem Apparat der glatten Muskelzelle hemmt und eine Vasodilatation bedingt (Abb. 3) (Rogers et al., 2007b; Schleifenbaum et al., 2010; Tykocki et al., 2017a).

Eine selektive Blockade der in dieser Arbeit untersuchten $Kv_{1.5}$ -Kanäle erfolgte mittels DPO-1, die der $Kv_{2.1}$ -Kanäle mittels Stromatoxin (STX), dem Toxin der afrikanischen Tarantel *Stromatopelma calceata*, und die der Kv_7 -Kanäle mittels XE991 (Nelson und Quayle, 1995; Stump et al., 2005; Tsvetkov et al., 2016; Tykocki et al., 2017a; Zhang et al., 2021).

Eine Hemmung der Kv -Kanäle ist neben der Blockade durch die aufgeführten Kaliumkanalblocker auch durch den intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration sowie die Hyperpolarisation der Zellmembran – induziert durch die Öffnung anderer Kaliumkanäle oder den Schluss von Natrium-, Calcium- oder Chloridkanälen – möglich. Bei verringertem Ausstrom von Kaliumionen resultiert eine Depolarisation der Zellmembran mit Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit spannungsabhängiger Calciumkanäle, daraus folgendem intrazellulärem Anstieg der Calciumkonzentration und letztlich Zunahme der Vasokonstriktion der glatten Gefäßmuskelzelle (Abb. 3) (Jackson, 2018; Tykocki et al., 2017a).

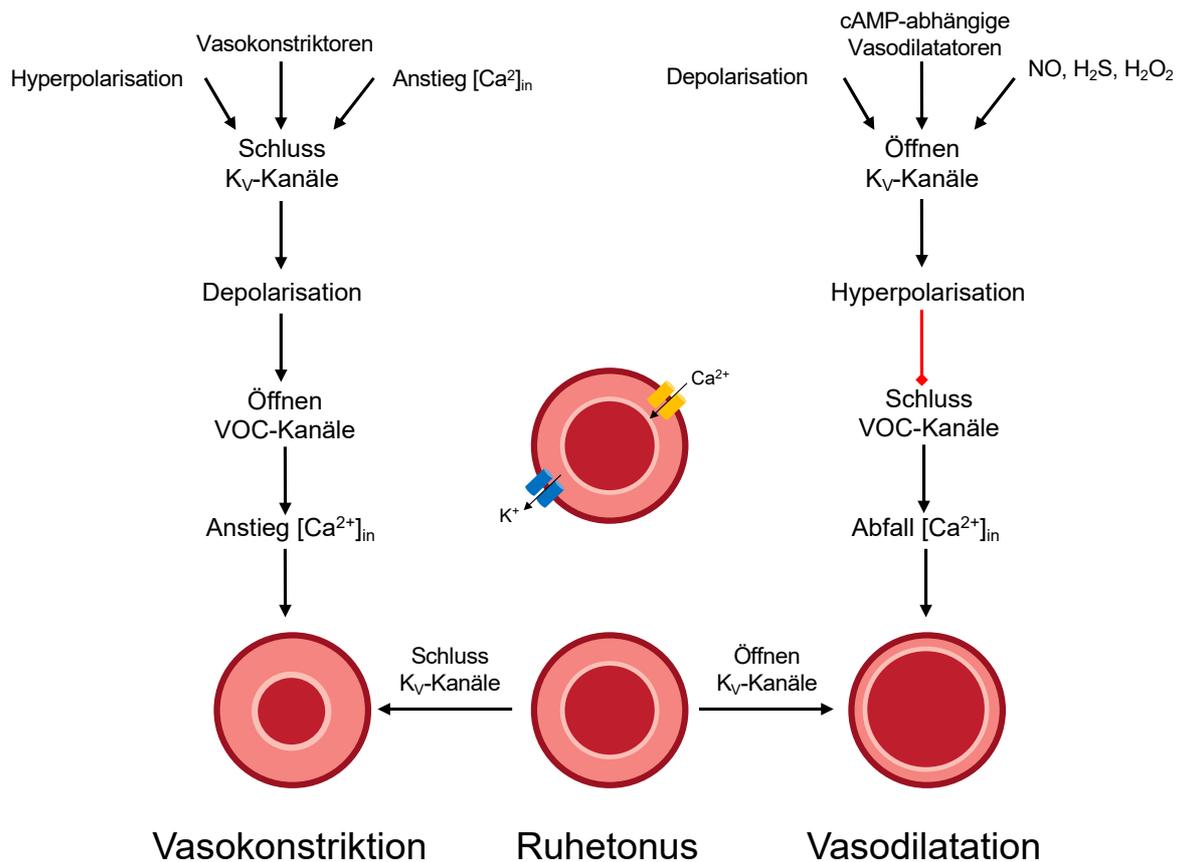


Abbildung 3: Regulationsmechanismen spannungabhängiger Kaliumkanäle und Auswirkungen auf den vaskulären Tonus (Eigene Darstellung in Anlehnung an Jackson, 2018 und Tykocki et al 2017a) K_v =spannungabhängiger Kaliumkanal; VOC =spannungabhängiger Calciumkanal vom L-Typ; NO =Stickstoffmonoxid; H_2S =Schwefelwasserstoff; H_2O_2 =Wasserstoffperoxid; $[Ca^{2+}]_{in}$ =intrazelluläre Calciumkonzentration

1.4.2 Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca})

Calcium-aktivierte Kaliumkanäle (BK_{Ca}) sind sehr häufig in der Zellmembran der glatten Gefäßmuskulatur vertreten und weisen eine hohe Leitfähigkeit für Kaliumionen auf. Sie reagieren auf intravasalen Druckanstieg und kontraktile Agonisten. Dies aktiviert die Kanäle zum einen spannungsabhängig durch Depolarisation der Zellmembran und andererseits durch einen intrazellulären Konzentrationsanstieg von Calciumionen, welcher seinerseits zuvor über spannungsabhängige Calciumkanäle der Zellmembran oder über den Ryanodin-Rezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums erfolgte (Abb. 4) (Gollasch et al., 2000; Jaggar et al., 2000; Latorre et al., 2017; Nelson et al., 1995; Tykocki et al., 2017a).

Vor allem die Calcium-Funken aus dem sarkoplasmatischen Retikulum scheinen hierbei von Bedeutung zu sein (Gollasch et al., 2000; Jaggar et al., 2000).

Entsprechend ihrer Nomenklatur weisen sie eine besonders hohe Leitfähigkeit für Kaliumionen auf. Bedingt durch die große Leitfähigkeit kann bereits die Aktivierung weniger Kanäle großen Einfluss auf das Membranpotential ausüben. Nach Aktivierung erfolgt der Ausstrom von Kaliumkationen aus dem Zellinneren mit entsprechender Hyperpolarisation des Membranpotentials.

Dieser Kanaltypus dient demnach bei kontraktile Stimulation der Regulation des myogenen Tonus, in dem im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus die calciumgetriggerte Vasokonstriktion limitiert wird (Jackson, 2000; Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a).

BK_{Ca}-Kanäle werden ebenso durch Bindung von Vasodilatoren (bspw. Adenosin) an G_s-gekoppelte Rezeptoren der glattmuskulären Zellmembran aktiviert, indem die Stimulation der Adenylatzyklase über gesteigerte Produktion des zyklischen Nukleotids cAMP die Proteinkinase A zur Phosphorylierung dieser Kaliumkanäle anregt (Abb. 4). cAMP scheint zudem die intrazelluläre Calciumkonzentration sowie die Frequenz der Calcium-Funken zu steigern, was gleichermaßen die Offenwahrscheinlichkeit der BK_{Ca}-Kanäle zu erhöhen scheint (Porter et al., 1998; Tykocki et al., 2017a).

Endotheliales wie auch aus Nitrovasodilatoren (bspw. Natrium-Nitroprussid) freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert die lösliche Guanylatzyklase (sGC) im Zytosol der glatten Muskelzellen. Über das vermehrt entstandene cyclische Nukleotid cGMP erfolgt die Stimulation der Proteinkinase G (PKG), die über Phosphorylierung spezifisch BK_{Ca}-Kanäle aktiviert (Abb. 4) (Robertson et al., 1993; Schmid et al., 2018; Tykocki et al., 2017a). Zudem scheint Stickstoffmonoxid (NO) auch die Frequenz der Calcium-Funken modulieren und damit die Offenwahrscheinlichkeit (Mandalà et al., 2007) der BK_{Ca}-Kanäle erhöhen zu können. Auch das Potential zur direkten Aktivierung der BK_{Ca}-Kanäle durch Stickstoffmonoxid (NO) wird angenommen (Bolotina et al., 1994).

Aus dem Metabolismus bzw. Endothel freigesetztes Kohlenstoffmonoxid (CO) wie auch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) können über die direkte Aktivierung von BK_{Ca}-Kanälen und Kohlenstoffmonoxid zusätzlich über die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase vasodilatierend wirken (Abb. 4) (Tykocki et al., 2017a).

Eine hochselektive Blockade kann über Iberitoxin (IBTX), dem Toxin des indischen Skorpions *Buthus tamulus*, erfolgen. Die Inhibierung verstärkt die Effekte von Vasokonstriktoren wie beispielsweise Methoxamin (Mx). Gleichzeitig haben die meisten Vasokonstriktoren auch einen potenziell hemmenden Einfluss auf die calcium-aktivierten Kaliumkanäle (Abb. 4).

Dieser hemmende Einfluss wird über G_q -gekoppelte Rezeptoren mit konsekutiver Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt, die über eine Phosphorylierung die BK_{Ca} -Kanäle hemmt (Galvez et al., 1990; Latorre et al., 2017; Ma et al., 2020; Tykocki et al., 2017a; Wei et al., 2005; Zhang et al., 2021).

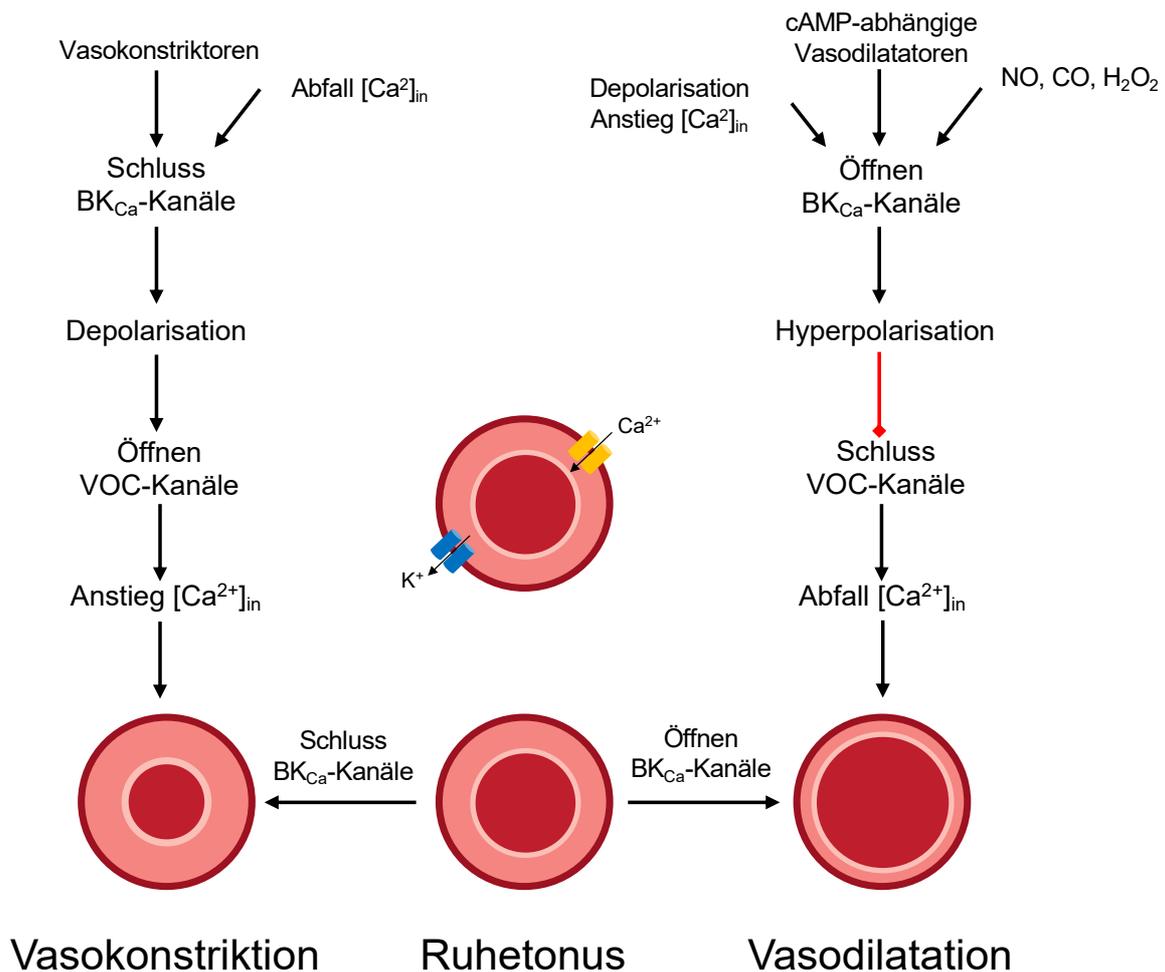


Abbildung 4: Regulationsmechanismen calcium-aktivierter Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit und Auswirkungen auf den vaskulären Tonus (Eigene Darstellung in Anlehnung an Jackson, 2018 und Tykocki et al 2017a) BK_{Ca} =calciumaktivierter Kaliumkanal; VOC=spannungsabhängiger Calciumkanal vom L-Typ; NO=Stickstoffmonoxid; CO=Kohlenstoffmonoxid; H_2O_2 =Wasserstoffperoxid; $[Ca^{2+}]_{in}$ =intrazelluläre Calciumkonzentration

1.4.3 Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})

Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle zeigen im aktivierten Zustand bei kontrollierten bzw. anliegenden Membranpotentialen negativer als das Gleichgewichtspotential für

Kalium (- 85 mV) einen summativ nach intrazellulär gerichteten Strom der Kaliumionen. Bei Membranpotentialen positiver als das Gleichgewichtspotential zeigt sich hingegen nur ein begrenzter auswärts gerichteter Fluss aufgrund einer Kanalblockade durch Magnesium und das Polyamin Spermin (Goldstein et al., 2001; Huang und Kuo, 2016; Jackson, 2000; Lu, 2004; Nelson und Quayle, 1995; Schubert et al., 2004; Sobey, 2001; Tykocki et al., 2017a). Unter physiologischen Bedingungen ist das Ruhemembranpotential (RP) der glatten Gefäßmuskelzellen stets positiver als das Gleichgewichtspotential (- 40 und - 55 mV), sodass Kaliumionen entsprechend dem elektrochemischen Gradienten das Zellinnere verlassen (Hirst et al., 1986; Nelson und Quayle, 1995).

Die Aktivität der einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle ist folglich abhängig von der extrazellulären Kaliumkonzentration sowie dem anliegenden Membranpotential. Die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht sich durch den extrazellulären Anstieg der Kaliumkonzentration, durch die Interaktion mit diversen Metaboliten sowie Signalmolekülen. Eine Hyperpolarisation der Zellmembran bedingt die Erhöhung der Leitfähigkeit dieser Kanäle (Hille, 1978; Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a).

Daneben ist wie bei den zuvor beschriebenen K_v - und BK_{Ca} -Kanälen eine Kanalaktivierung über endogenes (aus dem Endothel) oder exogenes (bspw. aus dem Donator Natrium-Nitroprussid) Stickstoffmonoxid (NO) über den NO/cGMP/PKG-Signalweg möglich (Schubert et al., 2004; Tykocki et al., 2017a).

Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle modulieren zudem die Dauer wie auch Kinetik der kaliuminduzierten Hyperpolarisation und Vasodilatation (Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a). Durch ihre Interaktion mit Metaboliten und Signalmolekülen koppeln sie Metabolismus und Perfusion. Sie tragen zum Erhalt des Ruhemembranpotentials bei, da sie eine hohe Leitfähigkeit vor allem bei negativen Membranpotentialen aufweisen (Hirst et al., 1986).

Die Expression, ihre Öffnungswahrscheinlichkeit sowie die spezifische Funktion sind gewebe- bzw. gefäßabhängig.

Eine Blockade ist bereits durch kleinste Mengen extrazellulären Bariums ($BaCl$) möglich. Besonders sensitiv gegenüber Barium zeigen sich die einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle vor allem bei negativem Membranpotential (Hagiwara

et al., 1978; Jackson, 2000; Nelson und Quayle, 1995; Park et al., 2008; Tykocki et al., 2017a).

1.4.4 ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP})

ATP-sensitive Kaliumkanäle sind nicht spannungsabhängig und sind der Familie der einwärts gleichrichtenden Kaliumkanäle (K_{ir}) zugeordnet. Wie diese interagieren sie mit einer Vielzahl von Metaboliten und Signalmolekülen.

Eine selektive Blockade dieser Ionenkanäle ist durch Sulfonylharnstoffe wie dem in dieser Arbeit verwendeten Glibenclamid (GLI) möglich (Brayden, 2002). Die Aktivierung erfolgt hingegen über eine Verminderung der intrazellulären Konzentration von Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Energieversorger von Zellen. Bei steigenden Konzentrationen nimmt die Kanalaktivität hingegen ab (Tykocki et al., 2017a).

ATP-sensitive Kaliumkanäle stellen demgemäß einen Sensor des metabolischen Zustands der glatten Gefäßmuskelzelle dar. Die Expression, Öffnungswahrscheinlichkeit sowie spezifische Funktion ist abhängig von Gewebe und Blutgefäß (Daut et al., 1994a; Daut et al., 1994b; Jackson, 2000; Nelson und Quayle, 1995; Thorneloe und Nelson, 2005; Tykocki et al., 2017a).

Neben der intrazellulären Konzentration von Adenosintriphosphat (ATP) integrieren auch verschiedene Vasokonstriktoren wie auch -dilatoren die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle.

Vasokonstriktoren wie bspw. Angiotensin II, Endothelin, Histamin, Noradrenalin nehmen über G_q -gekoppelte Rezeptoren, vermittelt über die Proteinkinase C (PKC), einen hemmenden Einfluss auf die Kaliumkanäle (Bonev und Nelson, 1996; Tykocki et al., 2017a). Zudem interagieren Vasokonstriktoren auch mit G_i -gekoppelten Rezeptoren und bewirken hierdurch die Hemmung der Adenylatzyklase, die ihrerseits über eine Konzentrationssteigerung des zyklischen Nukleotids cAMP die Proteinkinase A (PKA) aktivieren und hierüber die Offenwahrscheinlichkeit der Kaliumkanäle erhöhen würde (Hayabuchi et al., 2001; Tykocki et al., 2017a). Vasodilatoren (Bspw. Adenosin) aktivieren über G_s -gekoppelte Rezeptoren der glattmuskulären Zellmembran die zuvor beschriebene Signalkaskade (Jackson, 1993).

Darüber hinaus scheint eine Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle mit konsekutiver Vasodilatation auch über Stickstoffmonoxid (NO), vermittelt über den NO/cGMP/PKG-Signalweg, sowie durch Schwefelwasserstoff (H_2S) möglich (Tykocki et al., 2017a).

1.4.5 Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle (K_2P)

Zusätzlich zur Untersuchung der vier dominanten Familien von Kaliumkanälen der glatten Gefäßmuskulatur, fand in der vorgelegten Arbeit auch die Betrachtung der TASK-1 Kanäle statt, welche zur Familie der Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle gezählt werden.

Diese stabilisieren das Membranpotential nahe dem Kalium-Gleichgewichtspotential durch einen kaliumselektiven Hintergrundstrom, der auch als „Leckstrom“ bezeichnet wird. Dieser basiert auf der Tatsache, dass die Kanäle unabhängig vom aktuell anliegenden Membranpotential immer geöffnet sind und dem elektrochemischen Gradienten entsprechend in der Summe ein Ausstrom von Kaliumionen besteht. Spannungsabhängig zeigt sich eine Zunahme der Leitfähigkeit für Kalium bei gleichzeitig fehlendem Spannungssensor (Goldstein et al., 2001).

Diese Kanäle nähern das Membranpotential dem Gleichgewichtspotential von Kalium an. Dieses liegt bei -90 mV und ist damit deutlich negativer im Vergleich zum Ruhemembranpotential der glatten Gefäßmuskelzellen mit -40 und -55 mV (Daut et al., 1994b; Nelson und Quayle, 1995). In der Folge wird die elektrische Erregbarkeit von Zellen gehemmt.

Mittels AVE1231 ist eine selektive Blockade der TASK-1 Kanäle möglich (Ehrlich et al., 2008; Putzke et al., 2007; Streit et al., 2011). Ebenso kann durch AVE1231, bei Verwendung höherer Konzentrationen, eine Blockade der $Kv_{1.5}$ -Kanäle erfolgen, wenn sich diese im geöffneten Zustand befinden (Ehrlich et al., 2008).

Da sich in einer parallel durchgeführten Arbeit zeigte, dass TASK-1 Kanäle nicht an der in der vorgelegten Arbeit untersuchten Wirkung von Natrium-Nitroprussid (SNP) beteiligt sind, wurden diese Kanäle in der vorliegenden Arbeit nur in einer Versuchsreihe begutachtet.

1.5 Pharmakologie und Wirkmechanismen von Natrium-Nitroprussid (SNP)

Natrium-Nitroprussid (SNP) ist ein hochpotenter endothelunabhängiger Vasodilatator mit sehr kurzer Halbwertszeit, der therapeutisch vor allem im Bereich der Anästhesie sowie Intensivmedizin zur kontrollierten Blutdrucksenkung bei hypertensiven Blutdruckkrisen eingesetzt wird aber auch beim Krankheitsbild der Angina pectoris oder zur Senkung der Nachlast im Rahmen der erweiterten Herzinsuffizienztherapie Anwendung findet (Feelisch, 1998; Hottinger et al., 2014; Larsen, 2012).

Die Wirkung von Natrium-Nitroprussid (SNP) beruht auf der nicht enzymatischen und endothelunabhängigen Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) in glatten Gefäßmuskelzellen. Dieser Effekt ist unabhängig von autonomer Innervation und ohne Einflussnahme auf α - oder β -adrenerge Rezeptoren (Kreye und Reske, 1982).

Stickstoffmonoxid (NO) stimuliert im Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzellen das Enzym lösliche Guanylatzyklase (sGC), welches die Synthese von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert (Bonaventura et al., 2007). Hierbei gilt, dass Stickstoffmonoxid (NO) die Enzymaktivität reguliert. Je mehr Stickstoffmonoxidmoleküle angeboten werden, desto höher ist die Aktivität der lösliche Guanylatzyklase. Aus dem intrazellulären Anstieg von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) resultiert die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) (Francis et al., 2010).

Die von der cGMP-sensitiven Proteinkinase G getragene Phosphorylierung zellulärer Proteine, wie der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) sowie der ATP-abhängigen Calciumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), reduziert die intrazelluläre Calciumkonzentration sowie die Sensitivität des kontraktilem Apparates für Calcium. Letztes vor allem über die Beeinflussung der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) (Andriantsitohaina et al., 1995; Archer et al., 1994; Miller und Megson, 2007). Die intrazelluläre Calciumkonzentration wird zudem durch die Aktivierung von Calcium-ATPasen bzw. Natrium-Calcium-Austauschern der glattmuskulären Plasmamembran reduziert (Furukawa et al., 1991).

Durch die Proteinkinase G findet ferner die Phosphorylierung und damit Aktivierung der zuvor beschriebenen Kaliumkanäle statt. Entsprechend des elektrochemischen Gradienten für Kalium bedingt dies einen vermehrten Ausstrom der Kaliumkationen mit resultierender Hyperpolarisation der glattmuskulären Zellmembran. Spannungs-

abhängige Calciumkanäle vom L-Typ werden geschlossen und die intrazelluläre Calciumkonzentration gesenkt (Archer et al., 1994; Robertson et al., 1993; Schmid et al., 2018; Schubert et al., 2004; Tykocki et al., 2017a).

Der Abfall des für die unterschiedlichen Kontraktionsmechanismen essenziellen Calciums in Zusammenwirken mit der direkten Hemmung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) bedingt die Gefäßrelaxation.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Kaliumselektive Ionenkanäle glatter Gefäßmuskelzellen organnaher Arterien und Arteriolen nehmen über ihren Einfluss auf das Membranpotential eine zentrale Rolle bei der Regulation des peripheren Gefäßwiderstands und damit der bedarfsgerechten Verteilung des Herzzeitvolumens zu verschiedenen Organen ein (Daut et al., 1994b; Guyton, 1981; Pugsley und Tabrizchi, 2000; Rettig und Kuschinsky, 2013; Thorneloe und Nelson, 2005). Geringste Veränderungen des Membranpotentials bedingen deutliche Veränderungen des arteriellen Gefäßdurchmessers (Brayden und Nelson, 1992; Daut et al., 1994b; Nelson und Quayle, 1995). Für den Erhalt und die Modulation des Membranpotentials sind neben Calcium- und Chloridkanälen hauptsächlich mehrere Arten von Kaliumkanälen verantwortlich.

Es werden spannungsabhängige (K_v) und Calcium-aktivierte (BK_{Ca}), einwärts-gleichrichtende (K_{ir}) sowie Zweiporen-Domänen Kalium-Kanäle (K_2P) unterschieden (Goldstein et al., 2001; Jackson, 2000; Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a). Eine Erhöhung der Leitfähigkeit durch Aktivierung der Kaliumkanäle bedingt, entsprechend dem elektrochemischen Gradienten für Kalium, einen verstärkten nach extrazellulär gerichteten Strom der Kaliumkationen. In dessen Konsequenz tritt eine Hyperpolarisation des Membranpotentials ein, aus welcher der Schluss spannungsabhängiger Calciumkanäle resultiert. Konsekutiv folgt der Abfall der intrazellulären Konzentration des für die Kontraktion glatter Muskelzellen essenziellen Calciums (Freed und Gutterman, 2017; Khalil et al., 1987; Webb, 2003).

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v) werden durch die Depolarisation der Zellmembran und eine Reihe von vasoaktiven Agonisten aktiviert. Calcium-aktivierte Kaliumkanäle (BK_{Ca}) reagieren auf intravasalen Druckanstieg, vasoaktive Agonisten und werden spannungsabhängig sowie durch intrazellulären Calciumanstieg zum Beispiel im Rahmen einer Gefäßkontraktion aktiviert (Jackson, 2000; Latorre et al., 2017; Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a).

Im Gegensatz zu K_v - und K_{Ca} -Kanälen erhöht sich die Leitfähigkeit von einwärts-gerichteten Kaliumkanälen (K_{ir}) bei Hyperpolarisation der Zellmembran. Aktiviert werden diese Kanäle durch den extrazellulären Anstieg der Kaliumkonzentration sowie durch die Interaktion mit diversen Metaboliten und Signalmolekülen (Hille, 1978; Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a; Tykocki et al., 2017b). ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP}) sind den einwärts-gerichteten Kaliumkanälen zugeordnet. Wie diese interagieren sie mit einer Vielzahl von Signalstoffen. Die Aktivierung erfolgt ferner über die Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration (Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a).

Eine Relaxation arterieller Gefäße kann neben anderen Mechanismen durch eine Aktivierung unterschiedlicher Kaliumkanäle zum Beispiel durch Stickstoffmonoxid (NO) initiiert werden. Stickstoffmonoxid (NO) wird in vivo aus dem Gefäßendothel durch das Enzym endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) gebildet. Als Substrat dient die proteinogene α -Aminosäure L-Arginin (Denninger und Marletta, 1999; Ignarro et al., 1999; Palmer et al., 1988). Die Freisetzung erfolgt als Reaktion auf die Scherkräfte des Blutflusses (Ignarro, 2002; Miller und Megson, 2007).

Im Zytosol glatter Gefäßmuskelzellen stimuliert das gebildete Stickstoffmonoxid (NO) die lösliche Guanylatzyklase (sGC) und katalysiert die Synthese des zyklischen Nukleotids Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Dieser Prozess aktiviert die cGMP-sensitive Proteinkinase G (PKG), deren Phosphorylierung zellulärer Proteine ein Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration bedingt sowie direkt den kontraktilen Apparat der glatten Muskelzelle hemmt und letztlich eine Gefäßrelaxation bewirkt (Archer et al., 1994; Denninger und Marletta, 1999; Miller et al., 2004).

Endothelunabhängig kann Stickstoffmonoxid (NO) dem Gefäßsystem über NO-Donatoren, wie beispielsweise Natrium-Nitroprussid (SNP), zugeführt werden, welches Stickstoffmonoxid (NO) nicht-enzymatisch und frei von jeglicher neuraler Innervation freisetzt (Feelisch, 1998; Kreye und Reske, 1982; Miller und Megson, 2007). Als hochpotenter Vasodilatator findet Natrium-Nitroprussid (SNP) vor allem in der Anästhesie und Intensivmedizin Anwendung (Larsen, 2012).

Bereits in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Kaliumkanäle durch Stickstoffmonoxid (NO) möglicherweise direkt (Bolotina et al., 1994; Homer und

Wanstall, 2000; Mistry und Garland, 1998; Plane et al., 1996) – für gegenteilige Daten siehe (Gagov et al., 2022) – oder indirekt über den NO/cGMP/PKG- Signalweg (Archer et al., 1994; Félétou und Vanhoutte, 2006; Gagov et al., 2022; Murphy und Brayden, 1995; Robertson et al., 1993; Schmid et al., 2018; Schubert et al., 2004; Tykocki et al., 2017a) aktiviert werden und folglich eine Gefäßrelaxation induziert wird. Dies wurde durch unterschiedliche Kaliumkanäle vermittelt: spannungsabhängige Kv_1 - (Dick et al., 2008), Kv_2 - (Tanaka et al., 2006) sowie Kv_7 -Kanäle (Stott et al., 2015; Stott und Greenwood, 2015), ATP-abhängige Kir_6 -Kanäle (Miyoshi et al., 1994; Murphy und Brayden, 1995), einwärts-gleichrichtende Kir_2 -Kanäle (Schubert et al., 2004) sowie Calcium-aktivierte BK_{Ca} -Kanäle (Archer et al., 1994; Bolotina et al., 1994; Gagov et al., 2022; Mistry und Garland, 1998; Plane et al., 1996; Robertson et al., 1993; Schmid et al., 2018).

Da in den zitierten Untersuchungen jedoch meist nur ein Kaliumkanal im Fokus stand und in diesen Untersuchungen unterschiedliche Gefäße und Spezies verwendet wurden, ist unklar, ob in einem Gefäß ein oder mehrere Kaliumkanäle die Wirkung von Stickstoffmonoxid (NO) vermitteln können.

Die hier vorgelegte Studie untersucht systematisch die Beteiligung aller bisher in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesenen Kaliumkanäle an der durch den NO-Donator Natrium-Nitroprussid (SNP) induzierten Gefäßrelaxation am Beispiel der Arteria saphena der männlichen Wistar Ratte mittels Multiwire Myographie. Zur genaueren Ermittlung der Rolle der Kaliumkanäle werden einzelne Kaliumkanäle mittels spezifischer Kaliumkanalblocker funktionell deaktiviert.

Auf diese Weise wurde die Hypothese untersucht, dass der antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) gleichzeitig durch mehrere Kaliumkanäle vermittelt wird.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für alle Versuche wurden ausschließlich männliche Wistar Ratten (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle) verwendet. Sie erreichten den laboreigenen Tierstall im Alter von acht Wochen und verblieben dort zur Akklimatisierung mindestens eine weitere Woche.

Maximal vier Tiere wurden in einem 30 x 50 cm großem Käfig bei konstanter Temperatur von 22,0 °C untergebracht und ein 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus wurde eingestellt. Pelletfutter und Wasser standen jedem Tier in ausreichender Menge zum Erhaltungsstoffwechsel zur Verfügung.

Zur Vermeidung denkbarer zyklischer hormoneller Einflüsse wurden ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet. Diese gingen ab der zehnten Lebenswoche, mit einem Gewicht zwischen 350 und 400 g, in die Versuche über.

Am Versuchstag erfolgte zunächst eine Anästhesie mittels Kohlenstoffdioxid (CO₂), danach wurde die Halswirbelsäule mittels Labor-Guillotine durchtrennt. Unmittelbar nach Eintritt des Todes erfolgte die Organentnahme.

Alle durchgeführten Versuche stimmten mit dem Tierschutzgesetz überein und waren dem zuständigen Regierungspräsidium Karlsruhe angezeigt (Aktenzeichen I-17/17).

2.2 Verwendete Materialien und Geräte

2.2.1 Versuchslösungen

Für die Versuche am Myographen war es entscheidend, physiologische Umweltbedingungen für die isolierten Arteriensegmente zu simulieren. Nur so konnte die Vitalität der untersuchten Gefäße über den Versuch hinweg aufrechterhalten werden.

Eine physiologische Kochsalzlösung mit einer Temperatur von 37,0 °C und einem pH-Wert von 7,4 diente als Versuchslösung (Lösung I). Hierin befanden sich die isolierten Arteriensegmente während der Versuchszeit.

Für einen konstanten pH-Wert wurde zur Pufferung Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO_3) sowie 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) verwendet. Zusätzlich wurde mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff (O_2) und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO_2), begast. Hierdurch wurde entweichendes Kohlenstoffdioxid ausgeglichen und somit die Pufferkonzentration konstant gehalten.

Tabelle 1: Zusammensetzung Lösung I - Versuchslösung (pH 7,4 bei 37,0 °C)

Substanz	Konzentration
NaCl	120,0 mM
NaHCO_3	26,0 mM
KCl	4,5 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,2 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 mM
EDTA	0,025 mM
HEPES	5,0 mM
Glucose	5,5 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1,6 mM

Als Präparationslösung (Lösung II) diente eine 4,0 °C kalte Kochsalzlösung, die ausschließlich mit HEPES gepuffert wurde und kein Natriumhydrogenkarbonat enthielt. Dies war durch die im Rahmen der Präparation nicht durchführbare Begasung mit Carbogen begründet, da dies die Arbeit unter dem Stereomikroskop schwerwiegend beeinträchtigt hätte. Ohne Begasung kann jedoch das entweichende CO_2 nicht kompensiert werden, dies erklärt das Ausscheiden von Natriumhydrogenkarbonat als Puffersubstanz.

Durch die niedrige Temperatur während der Präparation und die alleinige Verwendung von HEPES konnte der pH-Wert jedoch weitestgehend konstant gehalten werden.

Tabelle 2: Zusammensetzung Lösung II - Präparationslösung (4,0 °C)

Substanz	Konzentration
NaCl	145,0 mM
KCl	4,5 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,2 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 mM
EDTA	0,025 mM
HEPES	5,0 mM

Im Rahmen des Startprotokolls fand zusätzlich eine Modifikation der Versuchslösung Anwendung. Bei dieser wurde die Konzentration von Natriumchlorid (NaCl) herabgesetzt und zeitgleich die Konzentration von Kaliumchlorid (KCl) deutlich gesteigert.

Tabelle 3: Zusammensetzung mod. Lösung I - KCl 120mM (pH7,4 bei 37,0 °C)

Substanz	Konzentration
NaCl	4,5 mM
NaHCO ₃	26,0 mM
KCl	120 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,2 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,6 mM
EDTA	0,025 mM
Glucose	5,5 mM
HEPES	5,0 mM

Alle Lösungen wurden jeden zweiten Tag frisch angesetzt und zur pH-Stabilisierung im Kühlschrank bei 4,0 °C aufbewahrt. So konnte eine konstante Qualität gesichert werden.

Vor Verwendung erfolgte ein Erwärmen auf 37,0 °C im Wasserbad und das Einstellen des pH-Werts auf 7,4 mittels Titration von verdünnter Salzsäure oder Natronlauge.

2.2.2 Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien mit Kurzbezeichnung, LOT- bzw. Chargennummer und Herstellerangaben

Chemikalie	Abkürzung	LOT-Nummer	Hersteller
10,10-bis(4-Pyridinyl-methyl)-9(10H)-anthracenonedihydrochlorid	XE991	2A/204803	Tocris
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	6C010351	Carl Roth
Acetylcholin Chlorid	Ach	BCBM4814V	Sigma Aldrich
2-(butylsulfonylamino)-N-[(1R)-1-(6-methoxypyridin-3-yl)propyl]benzamide	AVE1231		Sanofi-Aventis
Bariumchlorid-2-hydrat	BaCl ₂ x 2 H ₂ O		Riedel-de Haën
Calciumchlorid Dihydrat	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	A862982 824	Merck
D(+)-Glucose		4555236245	Carl Roth
Dimethylsulfoxid	DMSO	9X000596	Merck
Diphenylphosphinoxid-1	DPO-1	2A/204866	Tocris
Essigsäure		8J008408	AppliChem
Ethanol			Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	9Y008397	AppliChem
Glibenclamid	GLI	2A/21236	Tocris
Iberiotoxin	IBTX	STI400TX111	Alomone Labs
Kaliumchlorid	KCl	AM0663686626	Carl Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	SLBP6806V	Merck
Methoxamin Hydrochlorid	Mx	057K1607V	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	NaCl	306246767	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	A0314746 131	Merck
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	K45372729 421	Merck
Natriumhydroxid	NaOH	B0337382 905	Merck
Natrium-Nitroprussid Na ₂ [Fe(CN) ₅ NO] · 2H ₂ O	SNP		Sigma Aldrich

Phentolamin	PA	111H3433	Sigma Aldrich
Salzsäure	HCl	4I009369	AppliChem
Stromatoxin-1	STX	STS350 TX1005	Alomone Labs
9,11-Dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxyprostaglandin F2 α	U-46619		Merck

2.2.3 Geräte und Laborhilfsmittel

Tabelle 5: Geräte und Laborhilfsmittel mit spezifischer Bezeichnung und Herstellerangaben

Geräte und Laborhilfsmittel	Bezeichnung	Hersteller
Abzug		Caspar & Co. Labora GmbH
Analysenwaage CPA	CPA 225D	Sartorius AG Germany
Datenerfassungsgerät	PowerLab 8/30	ADInstruments
Gefrierschrank (-5,0°C bis -20,0°C)	Froster-520	Philipp Kirsch
Kaltlichtquelle	KL 200	Carl Zeiss GmbH
Kolbenhubpipette 0,1 - 2,5 μ L	Eppendorf Research	Eppendorf
Kolbenhubpipette 0,5 - 10 μ L	Eppendorf Research	Eppendorf
Kolbenhubpipette 10 - 100 μ L	Eppendorf Research	Eppendorf
Kolbenhubpipette 100 - 1000 μ L	Eppendorf Research	Eppendorf
Kolbenhubpipette 500 - 5000 μ L	Eppendorf Research	Eppendorf
Kühlschranke (4,0°C – 8,0°C)	profi line	Liebherr
Labor-Guillotine		
Magnetrührer (mit Heizplatte)	RH basic 2	IKA
Myograph	Multiwire System - 610 M Myograph	Danish Myo Technology
pH-Meter	HI2211	HANNA instruments
pH-Elektrode	HI1131	HANNA instruments
Präzisionswaage Extend	Extend	Sartorius AG Germany
Ständer für Kolbenhubpipetten		Eppendorf
Stereomikroskop	Stemi 2000	Carl Zeiss GmbH
Stoppuhr		Roth
Ultraschallbad	Emmi-05ST	EMAG Germany

Universal-Tischzentrifuge	Galaxy MiniStar	VWR International GmbH
Vakuumpumpe	Vacusaft comfort	IBS Integra Biosciences
Vortexer	Genius 3	IKA
Wasserbad	ED-5	Julabo Labortechnik GmbH

2.2.4 Software

Tabelle 6: Software mit Versionsnummer und Herstellerangaben

Software	Hersteller
Adobe Reader XI	Adobe Systems
EndNote 20	Clarivate Analytics
GraphPad Prism 9	GraphPad Software
LabChart 7	ADInstruments
LabChart 7 Reader	ADInstruments
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation
Microsoft Windows 7	Microsoft

2.2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Dumont-Pinzette Biologie Nr. 5	Dumont
Einmalkanülen	Becton Dickson
Entsorgungsbeutel	Carl Roth
Erlenmeyerkolben (1000mL, 2000mL, 5000mL)	Hirschmann
Falcontube (15mL)	greiner bio-one
Falcontube (50mL)	VWR International
Federschere n. VANNAS, fein, gerade, 8cm	Geuder
Fusselfreie Tücher	Kimberly Clark
Handschuhe	neoLab
Kanister (2,5L, 5L)	IKG
Labortücher	neoLab

Magnetrührstäbchen	VWR International
Magnetstab-Entferner	VWR International
Messzylinder (250mL, 1000mL)	Hirschmann
Messzylinder (50mL, 100mL)	Simax
Parafilm „M“	Bemis
Pasteurpipetten (1,5mL, 3mL)	neoLab
PCR SoftTubes (0,5mL)	Biozym
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten (0,5 - 20µL)	nerbe Plus
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten (100µL)	Star Lab
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten (200µL)	nerbe Plus
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten (5000µL)	Gilson
Plastikbecher (2000mL)	VWR International
Plastikbecher (50mL, 100mL, 0,5L, 1L)	Vitlab
Plastikbecher (5000mL)	Carl Roth
Plastikflasche (125mL, 250mL, 500mL, 1L)	Nalgene
Reaktionsgefäße (1,5mL, 2mL)	Star Lab
Stahldraht, rostfrei, säurebeständig, 40µm	Danish Myo Technology
Ständer für Reaktionsgefäße	neoLab
Wattestäbchen	Carl Roth

2.3 Isometrische Myographie

Die Kleingefäßmyographie (Mulvany und Halpern, 1976) ermöglicht es, die pharmakologischen, mechanischen und morphologischen Eigenschaften kleiner Blutgefäße *in vitro* zu untersuchen. Mittels Draht-Myographie (Multiwire Myograph System 610, Danish Myo Technology, Dänemark) wurde das Kontraktionsverhalten der zuvor isolierten Arteriensegmente unter isometrischen Bedingungen untersucht. Der Gefäßdurchmesser wurde folglich während des Versuches konstant gehalten und der Einfluss der untersuchten Substanzen auf das Kontraktionsverhalten der Gefäße konnte über Veränderungen der Wandspannung detektiert werden.

Der in den Versuchen verwendete Myograph setzte sich aus einer Steuereinheit mit vier angeschlossenen Messkammern – jede mit einem Kammervolumen von 5 mL –

zusammen und ermöglichte somit die gleichzeitige Untersuchung von vier Arterien-segmenten (Abb. 5). Über eine in die Steuereinheit integrierte Wärmeplatte wurden die einzelnen Messkammern und die darin befindliche Versuchslösung auf 37,0 °C erwärmt. Die aktuelle Temperatur in den Messkammern wurde mit einer Auflösung von 0,1 °C über eine angeschlossene Temperatursonde ermittelt.

Zudem wurde an die Steuereinheit eine Vakuumpumpe angeschlossen, die eine vollständige Evakuierung der Messkammern ermöglichte. Jede der Kammern wurde mit Carbogen begast.

In die Messkammern aus säurebeständigem Edelstahl ragten zwei Metallbacken hinein, zwischen denen die Arteriensegmente auf Draht aufgespannt wurden (Abb. 5). Eine der Klemmbacken einer jeden Kammer war mit einem Kraftaufnehmer verbunden. Dieser detektierte die durch die Gefäßwand ausgeübte Kraft mit einer Auflösung von 0,01 mN und leitete die Signale kabelgebunden an die Steuereinheit weiter.

Die andere Klemmbacke war mit einem Mikrometer verbunden und daher verschiebbar. Durch eine Drehung an der Mikrometerschraube war der Abstand zwischen den Klemmbacken und folglich der innere Durchmesser der aufgespannten Arteriensegmente in μm -Schritten zu verändern.

Während der Versuche wurden die Kammern jeweils mit einem Deckel versehen, um einer Evaporation der Versuchslösung vorzubeugen. Diese hatten mehrere Öffnungen, sodass parallel das Absaugen, die Begasung, Temperaturmessungen sowie die Applikation der Substanzen ohne Störungen der Arteriensegmente möglich war.

Die Steuereinheit mit ihren vier Messkammern war mit dem Datenerfassungsgerät PowerLab 8/30 (ADInstruments, Australien) verbunden. Über dieses und die zugehörige Software LabChart 7 (ADInstruments, Australien) erfolgte die Aufzeichnung der Messdaten. LabChart stellte hierbei die Veränderungen der Wandspannung als Kurve in Abhängigkeit zur Zeit dar.

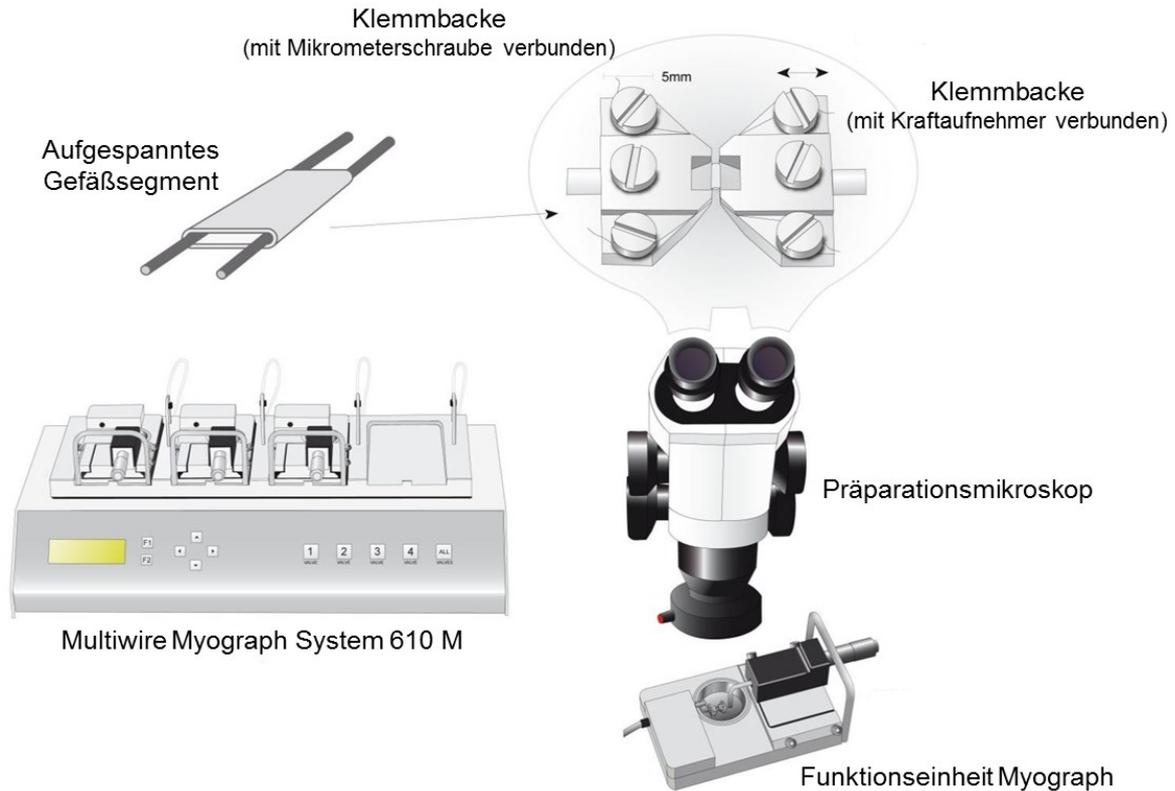


Abbildung 5: Isometrische Myographie (modifiziert nach <http://www.dmt.dk/default.asp?Action=Details&Item=492>, letzter Zugriff: 27.05.2017 13:04 Uhr, Danish Myo Technology A/S, Rho 14, DK-8382 Hinnerup, Denmark)

2.3.1 Gefäßpräparation

Bei allen Versuchen wurde die Arteria saphena verwendet, die aus der Arteria femoralis entspringt und mit ihren Ästen bei Säugetieren zur Versorgung des Mittelfußes dient (Gille, 2008). Beim Menschen ist sie embryonal angelegt, verkümmert jedoch bereits während der vorgeburtlichen Entwicklung. Äste der Arteriae tibialis anterior und posterior, die ihrerseits aus der Arteria poplitea entspringen und eine direkte Fortsetzung der Arteria femoralis darstellen, übernehmen die entsprechende Versorgung.

Die Arteria saphena der männlichen Wistar Ratte befindet sich oberflächlich an der Innenseite des Oberschenkels. Sie entspringt unmittelbar aus der Arteria femoralis im Schenkelspalt und zieht zusammen mit der Vena saphena und einem begleitenden Nerv über die Innenseite des Kniegelenks zum Unterschenkel.

Unmittelbar nach Todeseintritt des Versuchstieres wurde das Fell vom Rumpf und der Oberschenkelinnenseite vorsichtig abgelöst und danach das Hüftgelenk freigelegt,

ohne das hierbei Scherstress auf die bereits sichtbaren Gefäße durch Überdehnung der unteren Extremität ausgeübt wurde. Im nächsten Schritt wurde das freigelegte Hüftgelenk durchtrennt, um so den Oberschenkel komplett vom Rumpf des Tieres lösen zu können. Anschließend konnte weiteres Fell sowie störendes Fettgewebe rund um den Schenkel entfernt werden.

Der Schenkel wurde danach, mit seiner Innenseite zum Betrachter gerichtet, in eine Petrischale gelegt. Diese enthielt bereits die auf 4,0 °C gekühlte Präparationslösung. Nach Fixierung mittels Kanülen, konnte die Gefäßentnahme unter einem Stereomikroskop erfolgen (Abb. 5).

Mit einer Federschere wurde zunächst die oberste Bindegewebeschicht entfernt. Danach lag die Arterie inklusive ihrer begleitenden Vene und Nerv frei. Die begleitenden Strukturen wurden nun ebenfalls mit größter Sorgfalt entfernt und die Arterie konnte am distalen und proximalen Ende abgesetzt werden.

Es erfolgte die Aufteilung des Gefäßschlauches in vier Segmente à 2 mm und der Transfer in die vier Messkammern, welche zuvor mit jeweils 5 mL der kalten Präparationslösung gefüllt wurden.

2.3.2 Fixierung der Arteriensegmente in der Messkammer

In den Messkammern wurden die isolierten Arteriensegmente zwischen zwei Metallbacken fixiert. Zur Fixierung dienten jeweils zwei Drähte mit einer Stärke von 40 µm (Abb. 5). Über den ersten Draht erfolgte der Kontakt zum Kraftaufnehmer, über welchen die entwickelte Wandspannung gemessen werden konnte. Der zweite Draht war mit der Mikrometerschraube verbunden. Über diese konnte der Abstand zwischen den Drähten reguliert werden.

Zur Fixierung wurde zunächst der erste Draht zwischen die Backen eingeklemmt und mittels einer Schraube vorsichtig fixiert. Am freien Ende wurde anschließend der Gefäßschlauch aufgefädelt – hier galt es zu vermeiden, dass das Gefäß überdehnt bzw. Scherstress ausgesetzt wurde. Ebenso mussten Verletzungen der Gefäßwand vermieden werden.

Das Arteriensegment wurde im freien Raum zwischen den Metallbacken platziert und anschließend wurde das freie Drahtende wie zuvor mit einer Schraube fixiert. Analog wurde ein zweiter Draht durch das Lumen der Arterie platziert.

Störendes Bindegewebe, was zuvor bei der Gefäßentnahme verblieb, konnte abschließend behutsam entfernt werden.

Zum Abschluss der Präparation erfolgte das Entfernen der Endothelzellen der Tunica intima, um so deren vasorelaxierende Effekte vermeiden zu können. Hierzu wurde mit Hilfe der Mikrometerschraube das Gefäß etwas gedehnt, ein Barthaar der Ratte vorsichtig in das Lumen eingeführt und durch Rotationsbewegungen in zwei Richtungen die Zellen entfernt.

2.3.3 Normalisierung und Vitalitätstestung

Nach Fixierung der Gefäße erfolgte zunächst die Normalisierung zum Einstellen eines optimalen inneren Umfangs (IC_1) bei welchem die stärkste Kontraktion des aufgespannten Gefäßes zu erwarten war, da die Kontraktionsstärke, also die Interaktion zwischen den Aktin- und Myosinfilamenten, in Abhängigkeit zur passiven Dehnung steht.

Durch die Normalisierung konnten die Ausgangswerte der einzelnen Versuche standardisiert und die Gefäßantwort optimiert werden. Die Versuchsreihen waren somit untereinander vergleichbar.

Der angestrebte Umfang (IC_1) entsprach 90 % des inneren Umfangs (IC_{100}), welcher bei relaxiertem Gefäßzustand und einem transmuralen Druck von 13,3 kPa (100 mmHg) vorliegt.

Um den IC_1 zu bestimmen, wurden die Drähte mit Hilfe einer Mikrometerschraube zunächst so weit zusammengeführt, dass zwischen ihnen nur ein minimaler Abstand verblieb. In dieser Position war das Gefäßsegment folglich nicht vorgedehnt und verblieb relaxiert in der Messkammer. In diesem Zustand verblieb das Gefäß bis die Zieltemperatur von 37,0 °C erreicht wurde. Thermische Einflüsse auf die Kontraktilität konnten somit ausgeschlossen werden.

Sobald die Zieltemperatur erreicht war, konnten in mehreren Schritten die Drähte durch Drehungen an der Mikrometerschraube zunehmend voneinander entfernt und das Arteriensegment in der horizontalen Ebene gedehnt werden. Nach jedem dieser Schritte, die jeweils 90 Sekunden andauerten, wurden die korrespondierenden Werte von Innendurchmesser [μm] und die gemessene Wandspannung [mN/mm] gegeneinander aufgetragen. Es entstand eine Exponentialfunktion, deren Schnittpunkte mit

der dargestellten Funktion der 13,3 kPa (100 mmHg) Isobaren den IC_{100} -Wert darstellten. Von diesem Schnittpunkt wurde der IC_1 abgeleitet:

$$IC_1 = k \times IC_{100}$$

Formel 1: Optimaler innerer Umfang (IC_1)

IC_1 =optimaler innerer Umfang [μm]; k =Normalisierungsfaktor; IC_{100} =innerer Umfang bei 100mmHg [μm]

Der Normalisierungsfaktor k ist abhängig vom verwendeten Versuchstier und Blutgefäßtyp und betrug in dieser Arbeit 0,9 (Mulvany und Halpern, 1977).

Die Berechnung des Innenumfangs basierte auf dem Durchmesser sowie dem Abstand der beiden Drähte zueinander:

$$IC = (2 + \pi) \times d + 2 \times b$$

Formel 2: Berechnung Innenumfang

d =Drahtdurchmesser (40 μm); b =Abstand der Drähte [μm]

Die Länge der präparierten Arteriensegmente zeigte eine gewisse Varianz, so dass ein direkter Vergleich der auftretenden Kraft nicht sinnvoll war. Die jeweilige Gefäßlänge und die entwickelte Kraft wurden daher verwendet, um die auftretende Spannung der Gefäßwand zu berechnen:

$$T = \frac{F}{2L}$$

Formel 3: Spannung der Gefäßwand

T =Wandspannung [mN/mm]; F =Kraft [N]; L =Gefäßlänge [mm]

Anhand der Gleichung von LaPlace ließ sich der effektive Druck berechnen, um so den Schnittpunkt mit der Isobaren zu detektieren:

$$P = 2\pi \times \frac{T}{IC}$$

Formel 4: Gleichung nach LaPlace

P =effektiver Druck [kPa]; T =Wandspannung [mN/mm]; IC =innerer Gefäßumfang [μm]

Sämtliche Kalkulationen erfolgten durch die Software LabChart 7 (ADInstruments, Australien) nach Angabe der Gefäßlänge und des Drahtdurchmessers.

Abschließend musste nur die Mikrometerschraube auf den normalisierten inneren Umfang zurückgedreht werden, die ideale Vordehnung war eingestellt und die Präparationslösung konnte durch die Versuchslösung ersetzt werden. Bei stabilem Grundtonus erfolgte eine Vitalitätstestung und die allgemeine Kontraktionsfähigkeit wurde beurteilt. Hierzu wurden 10^{-5} M Methoxamin (Mx) (α_1 -Adrenorezeptoragonist)

appliziert, was unmittelbar eine Gefäßkontraktion auslöste (Trendelenburg et al., 1970). War dies erfolgreich, folgte nach fünf Minuten mit der Gabe von 10^{-5} M Acetylcholin (Einwirkzeit 3 min) die Kontrolle auf vollständige Entfernung des Endothels. Ersichtlich war dies anhand eines stabilen Kontraktionsniveaus. Nach mehreren Waschgängen mit der Versuchslösung – mit einer Dauer von jeweils fünf Minuten – erfolgte als abschließender Stimulus der Austausch der Versuchslösung mit der modifizierten Lösung mit 120 mM Kalium.

Diese Lösung musste anschließend ausgewaschen werden, sodass durch eine erneute Applikation von 10^{-5} M Methoxamin (Mx) für fünf Minuten das maximale Kontraktionsvermögen der aufgespannten Arteriensegmente (T_{\max}) definiert werden konnte.

Vor Beginn der jeweiligen Versuchsprotokolle musste der stabile Grundtonus durch erneute Waschgänge erreicht werden.

2.4 Versuchsprotokolle

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle unterschiedlicher Kaliumkanäle an der durch Natrium-Nitroprussid (SNP) vermittelten Gefäßrelaxation zu untersuchen. Zur Beurteilung diente die durch den α 1-Adrenorezeptoragonisten Methoxamin ausgelöste Kontraktion der Gefäße (Trendelenburg et al., 1970).

Bei stabilem Grundtonus erfolgte zunächst die Inkubation von 5 μ L destilliertem Wasser für 10 Minuten, an die sich die erste Konzentrations-Wirkungsbeziehung (DWK) für Methoxamin mit aufsteigenden Konzentrationen anschloss (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Konzentrations-Wirkungsbeziehung (DWK) für Methoxamin (Mx)

Stufe [mol/L]	Dauer [Min]
$1 \cdot 10^{-8}$	3
$3 \cdot 10^{-8}$	3
$1 \cdot 10^{-7}$	3
$3 \cdot 10^{-7}$	3
$1 \cdot 10^{-6}$	3
$3 \cdot 10^{-6}$	3
$1 \cdot 10^{-5}$	3

In den ersten sieben Versuchsreihen (siehe Tabelle 10) erfolgte die Blockade der in der Einleitung beschriebenen Kaliumkanäle durch eine Kombination der in dieser Arbeit untersuchten und verwendeten Kaliumkanalblocker (siehe Tabelle 9).

Um das Potential eines jeden untersuchten Kaliumkanals beurteilen zu können, wurde pro Versuchsreihe zunächst einer der Kaliumkanalblocker weggelassen. Der zugehörige Kanal stand dementsprechend zur Verfügung. Die Applikation dieses ausstehenden Kaliumkanalblockers erfolgte am Ende des jeweiligen Versuchstages. Eine Ausnahme hiervon stellte die Substanz AVE1231 (Putzke et al., 2007) dar, die sich nur in einer einzelnen Versuchsreihe wiederfand, da eine parallel durchgeführte Arbeit bereits zeigte, dass TASK-1 Kanäle nicht an der Wirkung von Natrium-Nitroprussid (SNP) beteiligt sind.

*Tabelle 9: Verwendete Kaliumkanalblocker mit jeweiliger Konzentration * AVE1231 nur in zweiter Versuchsreihe eingesetzt. Hierbei Applikation zum Blocker-Mix nach den ersten 10 von 20 Minuten Einwirkzeit*

Blocker	Konzentration [mol/L]	Fehlend im Blocker-Mix der Versuchsreihe
AVE1231	10^{-6}	*
BaCl	$3 \cdot 10^{-5}$	4
DPO-1	10^{-6}	6
GLI	10^{-6}	3
IBTX	10^{-7}	1
STX	10^{-7}	7
XE991	$3 \cdot 10^{-6}$	5

In einem weiteren Abschnitt dieser Arbeit erfolgte zudem die gezielte Blockade einzelner Kaliumkanäle. In diesen Versuchsreihen (siehe Tabellen 11, 12 und 13) wurde indessen die Konzentration des NO-Donators Natrium-Nitroprussid (SNP) variiert.

Tabelle 10: Versuchsprotokolle mit Mix aus verschiedenen Kaliumkanalblockern und Natrium-Nitroprussid (SNP) und anschließender Konzentrations-Wirkungsbeziehung (DWK) für Methoxamin (Mx) mit den Konzentrationen: 10^{-8} M, $3 \cdot 10^{-8}$ M, 10^{-7} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M. Die Einwirkzeit der aufsteigenden Methoxamin-Konzentration betrug jeweils drei Minuten. Kanal 1 dient als Kontrolle. * In der erster Versuchsreihe entfällt dieser Punkt, da alle untersuchten Kaliumkanäle blockiert wurden.

	Einwirkzeit				Einwirkzeit			Einwirkzeit		
	20 min		10 min		20 min		10 min	20 min		10 min
	1. DWK		2. DWK		3. DWK					
Kanal 1 KCl	Aqua	Mx	KCl 50 mM	Mx	Aqua	KCl 50 mM	Mx	Aqua	KCl 50 mM	Fehlender Kanalblocker*
Kanal 2 KCl + SNP	Aqua	Mx	KCl 50 mM	Mx	SNP 10^{-7} M	KCl 50 mM	Mx	SNP 10^{-7} M	KCl 50 mM	Fehlender Kanalblocker*
Kanal 3 Blocker	Aqua	Mx	Blocker-Mix	Mx	Aqua	Blocker-Mix	Mx	Aqua	Blocker-Mix	Fehlender Kanalblocker*
Kanal 4 Blocker + SNP	Aqua	Mx	Blocker-Mix	Mx	SNP 10^{-7} M	Blocker-Mix	Mx	SNP 10^{-7} M	Blocker-Mix	Fehlender Kanalblocker*

Tabelle 11: Versuchsprotokoll mit den Wirksubstanzen XE991 und Natrium-Nitroprussid (SNP) und anschließender Konzentrations-Wirkungsbeziehung (DWK) für Methoxamin (Mx) mit den Konzentrationen: 10^{-8} M, $3 \cdot 10^{-8}$ M, 10^{-7} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M. Einwirkzeit der aufsteigenden Methoxamin-Konzentration jeweils drei Minuten.

		Einwirkzeit		Einwirkzeit		Einwirkzeit		Einwirkzeit		
		10 min		10 min		10 min		Stabiles Niveau 10 min		
		1. DWK		2. DWK		3. DWK		4. DWK		
Kanal 1 KCl	Aqua	Mx	Aqua	Mx	Aqua	Mx	Aqua	Mx	KCl 50 mM	Aqua
Kanal 2 SNP	Aqua	Mx	Aqua	Mx	SNP 10^{-8} M	Mx	SNP 10^{-7} M	Mx	KCl 50 mM	SNP 10^{-7} M
Kanal 3 XE991	Aqua	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + Mx 10^{-6} M	Aqua
Kanal 4 XE991 + SNP	Aqua	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + SNP 10^{-8} M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + SNP 10^{-7} M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + Mx 10^{-6} M	SNP 10^{-7} M

Tabelle 12: Versuchsprotokoll mit den Wirksubstanzen Iberiotoxin (IBTX) und Natrium-Nitroprussid (SNP) und anschließender Konzentrations-Wirkungsbeziehung (DWK) für Methoxamin (Mx) mit den Konzentrationen: 10^{-8} M, $3 \cdot 10^{-8}$ M, 10^{-7} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M. Einwirkzeit der aufsteigenden Methoxamin-Konzentration jeweils drei Minuten.

	Einwirkzeit		Einwirkzeit		Einwirkzeit		Einwirkzeit			
	10 min		10 min		10 min		Stabiles Niveau		10 min	
	1. DWK		2. DWK		3. DWK		4. DWK			
Kanal 1 KCl	Aqua	Mx	Aqua	Mx	Aqua	Mx	Aqua	Mx	KCl 50 mM	Aqua
Kanal 2 SNP	Aqua	Mx	Aqua	Mx	SNP 10^{-8} M	Mx	SNP 10^{-7} M	Mx	KCl 50 mM	SNP 10^{-7} M
Kanal 3 IBTX	Aqua	Mx	IBTX 10^{-7} M	Mx	IBTX 10^{-7} M	Mx	IBTX 10^{-7} M	Mx	IBTX 10^{-7} M + Mx 10^{-6} M	Aqua
Kanal 4 IBTX + SNP	Aqua	Mx	IBTX 10^{-7} M	Mx	IBTX 10^{-7} M + SNP 10^{-8} M	Mx	IBTX 10^{-7} M + SNP 10^{-7} M	Mx	IBTX 10^{-7} M + Mx 10^{-6} M	SNP 10^{-7} M

Tabelle 13: Versuchsprotokoll mit den Wirksubstanzen XE991, Iberitoxin (IBTX) und Natrium-Nitroprussid (SNP) und anschließender Konzentrations-Wirkungsbeziehung (DWK) für Methoxamin (Mx) mit den Konzentrationen: 10^{-8} M, $3 \cdot 10^{-8}$ M, 10^{-7} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M. Einwirkzeit der aufsteigenden Methoxamin-Konzentration jeweils drei Minuten.

		Einwirkzeit		Einwirkzeit		Einwirkzeit		Einwirkzeit		
		10 min		10 min		10 min		Stabiles Niveau 10 min		
		1. DWK		2. DWK		3. DWK		4. DWK		
Kanal 1 KCl	Aqua	Mx	Aqua	Mx	Aqua	Mx	Aqua	Mx	KCl 50 mM	Aqua
Kanal 2 SNP	Aqua	Mx	Aqua	Mx	SNP 10^{-8} M	Mx	SNP 10^{-7} M	Mx	KCl 50 mM	SNP 10^{-7} M
Kanal 3 XE991-IBTX	Aqua	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M	Aqua
Kanal 4 XE991-IBTX + SNP	Aqua	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M + SNP 10^{-8} M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M + SNP 10^{-7} M	Mx	XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M	SNP 10^{-7} M

2.5 Datenanalyse und Statistik

Softwaregestützt erfolgte die Aufzeichnung der Kraftentwicklung gegen die Zeit (LabChart 7, ADInstruments, Australien). Zu zuvor definierten Zeitmarken wurden die jeweiligen Kraftwerte erfasst (Excel 2010, Microsoft Corporation, USA). Bei abfallenden Endstrecken der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (DWK) wurden 90 % des zuvor erreichten Maximums erfasst. Beim Auftreten von Oszillationen – diese traten bei bestimmten Kombinationen von Kaliumkanalblockern gehäuft auf – wurde der Mittelwert übernommen.

Zur Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchstage bzw. -reihen wurden die Messwerte in Relation zur maximalen Kontraktionskraft gesetzt, die im Rahmen der zweiten Applikation von Methoxamin definiert wurde:

$$T_{norm} = \frac{T}{T_{max}} \times 100\%$$

Formel 5: Normierte Kraftwerte

T_{norm}=normierte Kraft [N]; T=gemessene Kraft [N]; T_{max}=maximale Kontraktionskraft

Alle erfassten Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (SE) angegeben. Bei allen Versuchsreihen wurde jeweils nur eine Arterie pro Versuchstier verwendet, folglich entspricht n der Anzahl der Tiere und Gefäße.

Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, USA) mittels Varianzanalyse „repeated measures ANOVA“. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p=0,05 wurde als Signifikanzgrenze definiert.

3 ERGEBNISSE

Diese Studie untersuchte die Beteiligung von Kaliumkanälen an der durch Natrium-Nitroprussid (SNP) induzierten Gefäßrelaxation. Diese endothelunabhängige Vasodilatation basiert auf einer nichtenzymatischen Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Natrium-Nitroprussid (Feelisch, 1998; Miller und Megson, 2007; Schmid et al., 2018).

Für die Bestimmung der Wirkung von Natrium-Nitroprussid (SNP) über einen möglichst weiten Bereich der Gefäßkontraktilität wurde eine Gefäßkontraktion der Arteria saphena mittels Methoxamin (Mx), einem α 1-Adrenorezeptoragonisten, der nicht von präsynaptischen Nervenendigungen aufgenommen wird, induziert (Trendelenburg et al., 1970). Methoxamin erzeugte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Wandspannung in den untersuchten Gefäßsegmenten. Zur Beurteilung der Rolle einzelner Kaliumkanäle erfolgte abhängig von der Versuchsreihe die Blockade der anderen Kanäle mittels spezifischer Blockersubstanzen.

3.1 Antikontraktiler Effekt von Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle

Die funktionelle Ausschaltung aller Kaliumkanäle, deren Expression in der glatten Gefäßmuskelzelle demonstriert wurde (Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a), erfolgte durch $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 zur Blockade von Kv_7 -Kanälen (Greenwood und Ohya, 2009b; Ma et al., 2020; Robbins, 2001; Tsvetkov et al., 2016; Zhang et al., 2021), 10^{-6} M DPO-1 zur Blockade der $Kv_{1.5}$ -Kanäle (Lagrutta et al., 2006; Stump et al., 2005; Tsvetkov et al., 2016; Zhang et al., 2021), 10^{-7} M Stromatoxin zur Blockade der $Kv_{2.1}$ -Kanäle (Chen et al., 2010; Escoubas et al., 2002; Tsvetkov et al., 2016; Zhang et al., 2021), 10^{-6} M Glibenclamid zur Blockade der Kir_6 -Kanäle (Bonev und Nelson, 1996; Brayden, 2002; Quast et al., 1992; Quayle et al., 1997; Schubert et al., 1997; Standen et al., 1989), $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid zur Blockade der Kir_2 -Kanäle (Alagem et al., 2001; Hagiwara et al., 1978; Park et al., 2008; Robertson et al., 1996; Schubert et al., 2004; Tykocki et al., 2017a), 10^{-7} M Iberiotoxin zur Blockade der BK_{Ca} -Kanäle (Galvez et al., 1990; Kaczorowski et al., 1996; Ma et al., 2020; Tykocki et al., 2017a; Zhang et al., 2021) sowie 10^{-6} M AVE1231 zur Blockade der TASK-1-Kanäle (Ehrlich et al., 2008; Kiper et al., 2015; Putzke et al., 2007; Streit et al., 2011).

Die Vorbehandlung der Arteriensegmente mit Kaliumchlorid in einer Konzentration von 50 mM steigerte die extrazelluläre Konzentration der Kaliumionen, so dass der elektrochemische Gradient für Kalium stark reduziert wurde und selbst bei geöffneten Kaliumkanälen keine Beeinflussung des Membranpotentials mehr stattfinden konnte. Hieraus resultierte eine deutliche Erhöhung der Wandspannung der Gefäße (Abb. 6 A). Die zusätzliche Gabe von aufsteigenden Methoxamin-Konzentrationen erhöhte die normalisierte Wandspannung weiter (Abb. 6 A).

Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte diese Kontraktion deutlich ab (Abb. 6 A), zeigte folglich einen antikontraktilen Effekt. Unter den vorherrschenden Bedingungen stellte dies den von den Kaliumkanälen unabhängigen antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxid-Donators dar.

Die Gabe aller oben genannten Kaliumkanalblocker und die zusätzliche Gabe von aufsteigenden Konzentrationen des α_1 -Adrenorezeptoragonisten Methoxamin kontrahierten die untersuchten Arteriensegmente ähnlich stark, wie es bei der Anwendung von 50 mM Kaliumchlorid und Methoxamin zu beobachten war (Abb. 6 A, B; repeated measures ANOVA; $n=7$, $p=0,31$).

Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte diese Kontraktion ebenfalls deutlich ab (Abb. 6 B), für diesen antikontraktilen Effekt konnte kein Unterschied zu demjenigen nach der Vorbehandlung der Gefäße mit 50 mM Kaliumchlorid detektiert werden (Abb. 6 C).

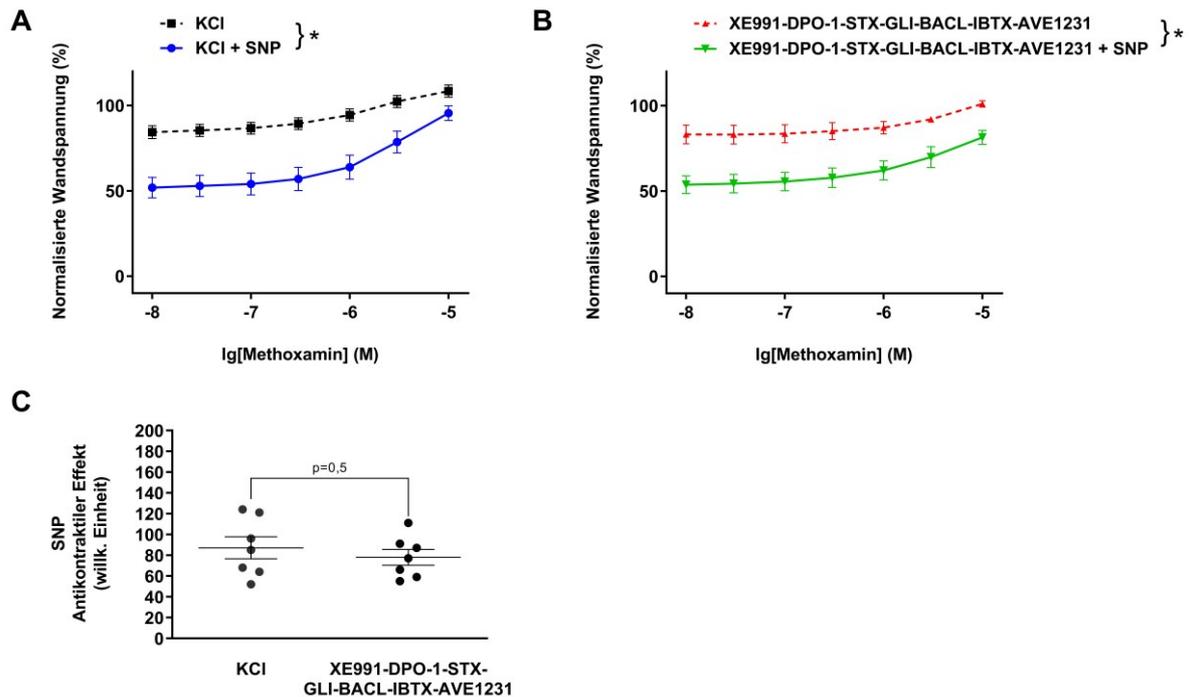


Abbildung 6: Antikontractiler Effekt von 10^{-7} M SNP nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und 50 mM Kaliumchlorid in Abwesenheit (KCl) und Anwesenheit (KCl + SNP) von SNP 10^{-7} M (repeated measures ANOVA; n=7, * - p<0,05)
- B) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und der Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid, 10^{-7} M Iberiotoxin und 10^{-6} M AVE1231 in Abwesenheit (XE991-DPO-1-STX-GLI-BACL-IBTX-AVE1231) und Anwesenheit von 10^{-7} M SNP (XE991-DPO-1-STX-GLI-BACL-IBTX-AVE1231+SNP) (repeated measures ANOVA; n=7, * - p<0,05)
- C) Antikontractiler Effekt von 10^{-7} M SNP in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid (KCl) bzw. der Kanalblocker $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid, 10^{-7} M Iberiotoxin und 10^{-6} M AVE1231 (XE991-DPO-1-STX-GLI-BACL-IBTX-AVE1231) (t-Test; n=7)

Da in einem anderen Projekt des Labors gezeigt werden konnte, dass TASK-1 Kanäle nicht am antikontractilen Effekt von Natrium-Nitroprussid beteiligt sind, wurde in den nachfolgenden Versuchsreihen auf deren Blockade durch AVE1231 verzichtet.

3.2 Funktionelle Rolle des Kir₆-Kanals

Auch in dieser Versuchsserie wurde ein von den Kaliumkanälen unabhängiger antikontractiler Effekt des Stickstoffmonoxid-Donators Natrium Nitroprussid (SNP) in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid beobachtet (Abb. 7 A).

Die Gabe der zuvor genannten Kaliumkanalblocker unter Ausschluss von Glibenclamid und die zusätzliche Gabe von aufsteigenden Methoxamin-

Konzentrationen kontrahierte die Arteriensegmente ähnlich stark, wie es bei der Vorbehandlung mit Kaliumchlorid und Methoxamin zu beobachten war (Abb. 7 A, B; repeated measures ANOVA; n=6, p=0,98). Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch Kaliumkanalblocker ohne Glibenclamid erzeugte Kontraktion deutlich ab (Abb. 7 B). Für diesen antikontraktilen Effekt konnte kein Unterschied zu demjenigen nach der Vorbehandlung der Gefäße mit 50 mM Kaliumchlorid detektiert werden (Abb. 7 C).

Nach Vorkontraktion der Gefäße mit den genannten Kaliumkanalblockern unter Ausschluss von Glibenclamid konnte bei der späteren Hinzugabe von 10^{-6} M Glibenclamid keine weitere Zunahme der Wandspannung detektiert werden, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 7 D).

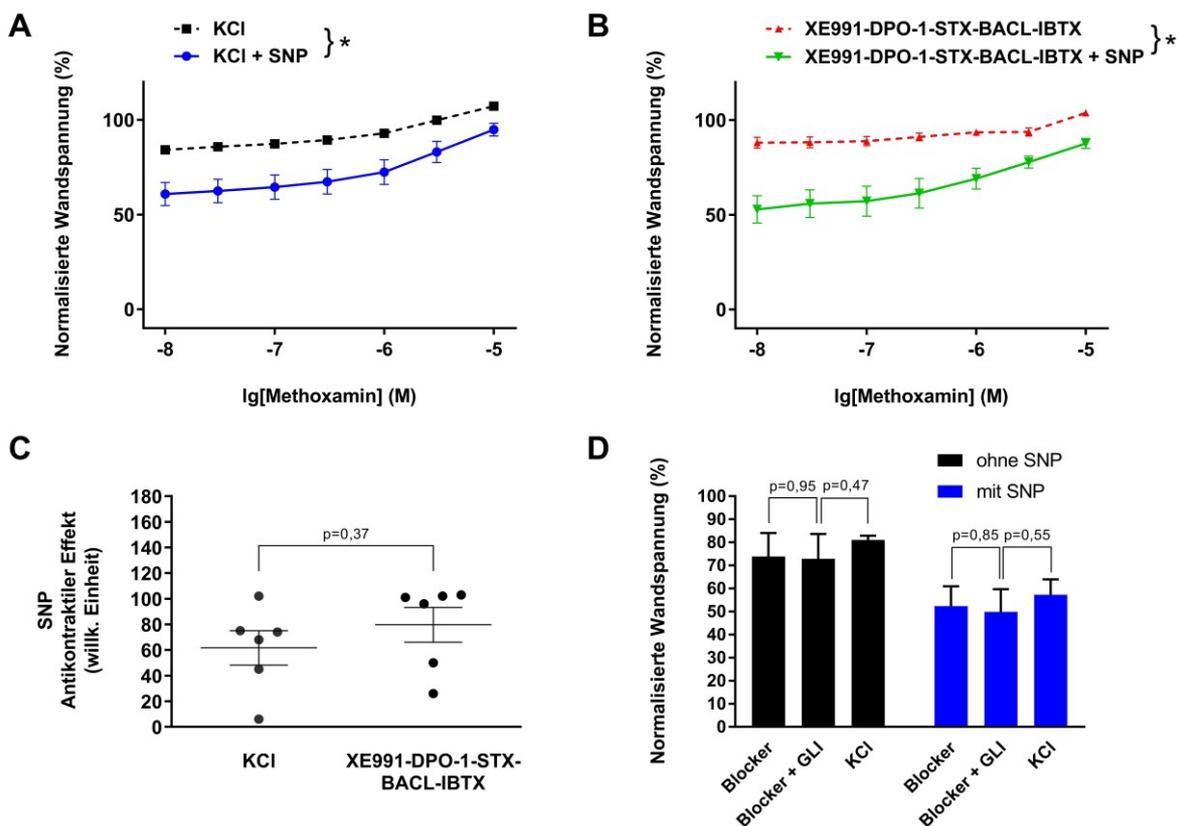


Abbildung 7: Antikontractiler Effekt von 10^{-7} M SNP nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle außer des Kir_6 -Kanals

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und Kaliumchlorid in Abwesenheit (KCl) und Anwesenheit (KCl + SNP) von SNP 10^{-7} M (repeated measures ANOVA; n=6, * - $p < 0,05$)
- B) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und der Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberiotoxin in Abwesenheit (XE991-DPO-1-STX-BACL-IBTX) und Anwesenheit von 10^{-7} M SNP (XE991-DPO-1-STX-BACL-IBTX+SNP) (repeated measures ANOVA; n=6, * - $p < 0,05$)
- C) Antikontraktiler Effekt von 10^{-7} M SNP in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid (KCl) bzw. der Kanalblocker $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberiotoxin (XE991-DPO-1-STX- BACL-IBTX) (t-Test; n=6)
- D) Wandspannung der Gefäße, induziert durch die Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberiotoxin vor (Blocker) und nach Gabe von 10^{-6} M Glibenclamid (Blocker + GLI) in Abwesenheit (schwarze Balken) und Anwesenheit (blaue Balken) von SNP 10^{-7} M (t-Test; n=6)

3.3 Funktionelle Rolle des Kir₂-Kanals

Auch in dieser Versuchsserie wurde ein von den Kaliumkanälen unabhängiger antikontraktiler Effekt des Stickstoffmonoxid-Donators Natrium Nitroprussid in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid beobachtet (Abb. 8 A).

Die Gabe der zuvor genannten Kaliumkanalblocker unter Ausschluss von Bariumchlorid und die zusätzliche Gabe von aufsteigenden Methoxamin-Konzentrationen kontrahierte die Arteriensegmente ähnlich stark, wie es bei der Vorbehandlung mit Kaliumchlorid und Methoxamin zu beobachten war (Abb. 8 A, B, repeated measures ANOVA; n=8, $p=0,13$). Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch Kaliumkanalblocker ohne Bariumchlorid erzeugte Kontraktion deutlich ab (Abb. 8 B). Für diesen antikontraktilen Effekt konnte kein Unterschied zu demjenigen nach der Vorbehandlung der Gefäße mit 50 mM Kaliumchlorid detektiert werden (Abb. 8 C).

Nach Vorkontraktion der Gefäße mit den genannten Kaliumkanalblockern unter Ausschluss von Bariumchlorid konnte bei der späteren Hinzugabe von $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid keine weitere Zunahme der Wandspannung detektiert werden, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 8 D).

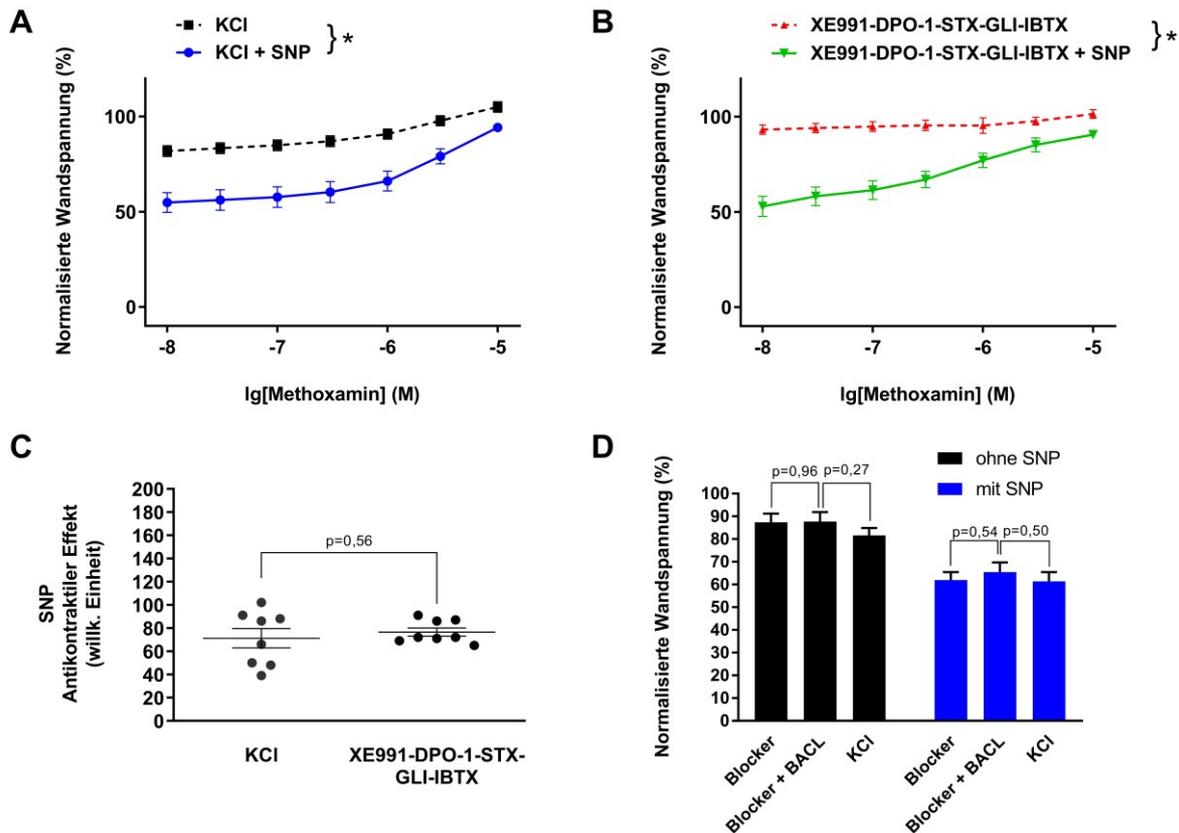


Abbildung 8: Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle außer des K_{ir2} -Kanals

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und Kaliumchlorid in Abwesenheit (KCl) und Anwesenheit (KCl + SNP) von SNP 10^{-7} M (repeated measures ANOVA; $n=8$, * - $p<0,05$)
- B) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und der Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid und 10^{-7} M Iberiotoxin in Abwesenheit (XE991-DPO-1-STX-GLI-IBTX) und Anwesenheit von 10^{-7} M SNP (XE991-DPO-1-STX-GLI-IBTX+SNP) (repeated measures ANOVA; $n=8$, * - $p<0,05$)
- C) Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid (KCl) bzw. der Kanalblocker $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid und 10^{-7} M Iberiotoxin (XE991-DPO-1-STX-GLI-IBTX) (t-Test; $n=8$)
- D) Wandspannung der Gefäße, induziert durch die Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid und 10^{-7} M Iberiotoxin vor (Blocker) und nach Gabe von $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid (Blocker + BACL) in Abwesenheit (schwarze Balken) und Anwesenheit (blaue Balken) von SNP 10^{-7} M (t-Test; $n=8$)

3.4 Funktionelle Rolle des K_{v1} -Kanals

Auch in dieser Versuchsserie wurde ein von den Kaliumkanälen unabhängiger antikontraktile Wirkung des Stickstoffmonoxid-Donators Natrium Nitroprussid in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid beobachtet (Abb. 9 A).

Die Gabe der zuvor genannten Kaliumkanalblocker unter Ausschluss von DPO-1 und die zusätzliche Gabe von aufsteigenden Methoxamin-Konzentrationen kontrahierte die Arteriensegmente ähnlich stark, wie es bei der Vorbehandlung mit Kaliumchlorid und Methoxamin zu beobachten war (Abb. 9 A, B; repeated measures ANOVA; n=8, p=0,31). Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch Kaliumkanalblocker ohne DPO-1 erzeugte Kontraktion deutlich ab (Abb. 9 B). Für diesen antikontraktilen Effekt konnte kein Unterschied zu demjenigen nach der Vorbehandlung der Gefäße mit 50 mM Kaliumchlorid detektiert werden (Abb. 9 C).

Nach Vorkontraktion der Gefäße mit den genannten Kaliumkanalblockern unter Ausschluss von DPO-1 konnte bei der späteren Hinzugabe von 10^{-6} M DPO-1 keine weitere Zunahme der Wandspannung detektiert werden, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 9 D).

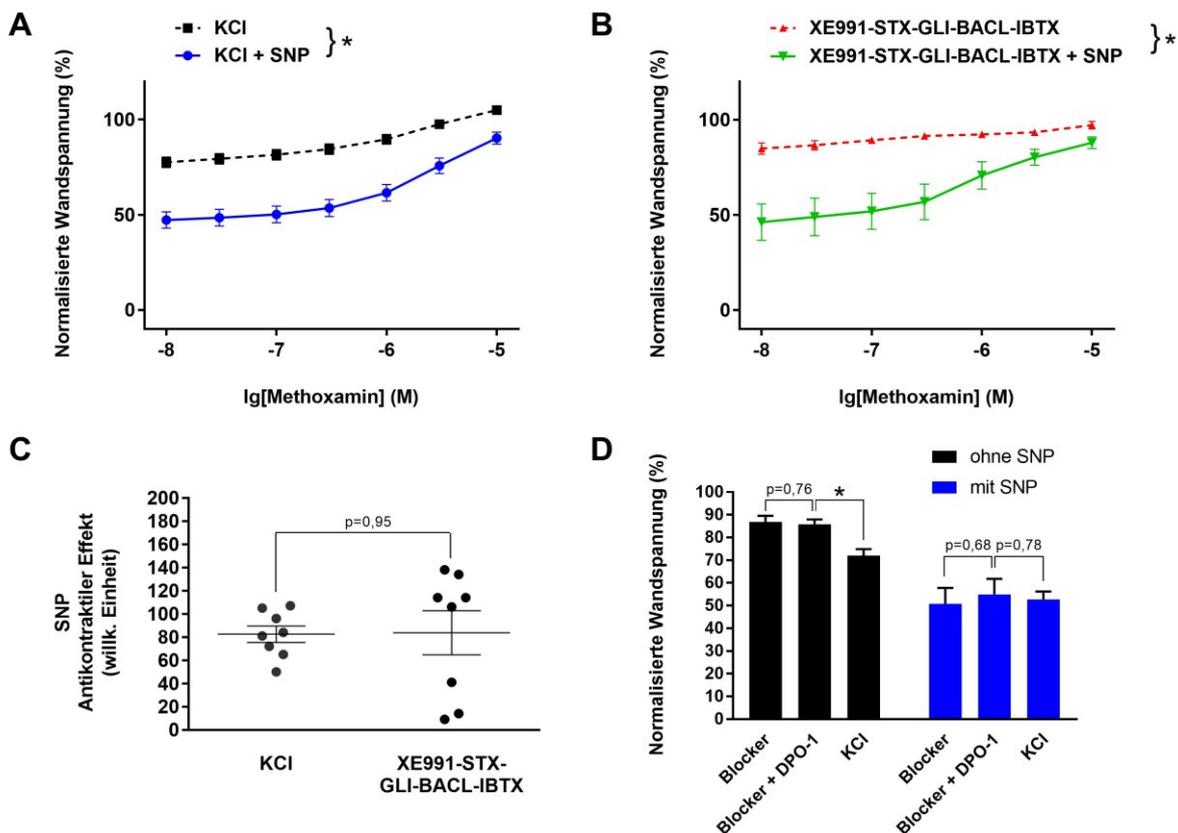


Abbildung 9: Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle außer des Kv_1 -Kanals

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und Kaliumchlorid in Abwesenheit (KCl) und Anwesenheit (KCl + SNP) von SNP 10^{-7} M (repeated measures ANOVA; n=12, * - $p < 0,05$)
- B) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und der Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberiotoxin in Abwesenheit (XE991-STX-GLI-BACL-IBTX) und Anwesenheit von 10^{-7} M SNP (XE991-STX-GLI-BACL-IBTX + SNP) (repeated measures ANOVA; n=12, * - $p < 0,05$)
- C) Antikontraktiler Effekt von 10^{-7} M SNP in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid (KCl) bzw. der Kanalblocker $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberiotoxin (XE991-STX-GLI-BACL-IBTX) (t-Test; n=12)
- D) Wandspannung der Gefäße, induziert durch die Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberiotoxin vor (Blocker) und nach Gabe von 10^{-6} M DPO-1 (Blocker + DPO-1) in Abwesenheit (schwarze Balken) und Anwesenheit (blaue Balken) von SNP 10^{-7} M (t-Test; n=12, * - $p < 0,05$)

3.5 Funktionelle Rolle des Kv_2 -Kanals

Auch in dieser Versuchsserie wurde ein von den Kaliumkanälen unabhängiger antikontraktiler Effekt des Stickstoffmonoxid-Donators Natrium Nitroprussid in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid beobachtet (Abb. 10 A).

Die Gabe der zuvor genannten Kaliumkanalblocker unter Ausschluss von Stromatoxin und die zusätzliche Gabe von aufsteigenden Methoxamin-Konzentrationen kontrahierte die Arteriensegmente ähnlich stark, wie es bei der Vorbehandlung mit Kaliumchlorid und Methoxamin zu beobachten war (Abb. 10 A, B; repeated measures ANOVA; n=10, $p=0,91$). Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch Kaliumkanalblocker ohne Stromatoxin erzeugte Kontraktion deutlich ab (Abb. 6 B). Für diesen antikontraktilen Effekt konnte kein Unterschied zu demjenigen nach der Vorbehandlung der Gefäße mit 50 mM Kaliumchlorid detektiert werden (Abb. 10 C).

Nach Vorkontraktion der Gefäße mit den genannten Kaliumkanalblockern unter Ausschluss von Stromatoxin konnte bei der späteren Hinzugabe von 10^{-7} M Stromatoxin keine weitere Zunahme der Wandspannung detektiert werden, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 10 D).

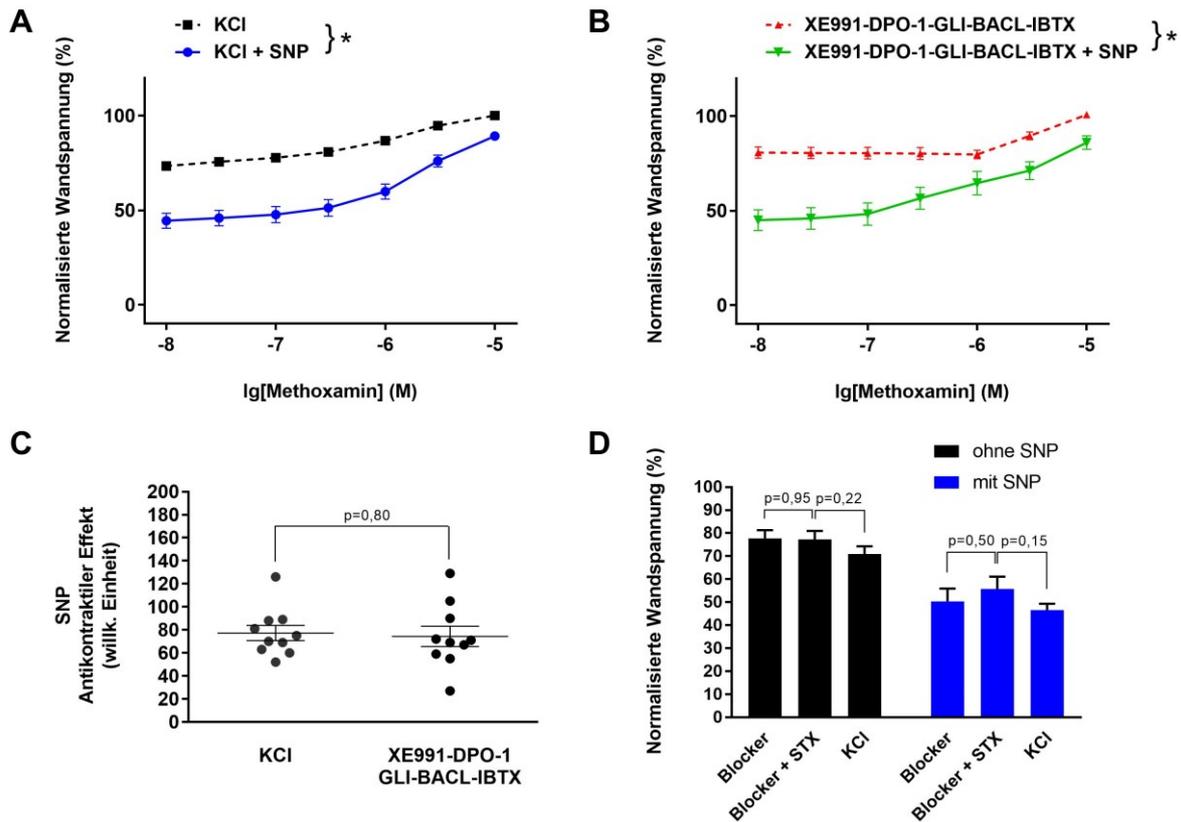


Abbildung 10: Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle außer des Kv_2 -Kanals

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und Kaliumchlorid in Abwesenheit (KCl) und Anwesenheit (KCl + SNP) von SNP 10^{-7} M (repeated measures ANOVA; n=10, * - $p < 0,05$)
- B) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und der Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberitoxin in Abwesenheit (XE991-DPO-1-GLI-BACL-IBTX) und Anwesenheit von 10^{-7} M SNP (XE991-DPO-1-GLI-BACL-IBTX + SNP) (repeated measures ANOVA; n=10, * - $p < 0,05$)
- C) Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid (KCl) bzw. der Kanalblocker $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberitoxin (XE991-DPO-1-GLI-BACL-IBTX) (t-Test; n=10)
- D) Wandspannung der Gefäße, induziert durch die Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberitoxin vor (Blocker) und nach Gabe von 10^{-7} M Stromatoxin (Blocker + STX) in Abwesenheit (schwarze Balken) und Anwesenheit (blaue Balken) von SNP 10^{-7} M (t-Test; n=10, * - $p < 0,05$)

3.6 Funktionelle Rolle des Kv_7 -Kanals

Auch in dieser Versuchsserie wurde ein von den Kaliumkanälen unabhängiger antikontraktile Wirkung des Stickstoffmonoxid-Donators Natrium Nitroprussid in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid beobachtet (Abb. 11 A).

Die Gabe der zuvor genannten Kaliumkanalblocker unter Ausschluss von XE991 und die zusätzliche Gabe von aufsteigenden Methoxamin-Konzentrationen kontrahierte die aufgespannten Arteriensegmente deutlich schwächer, als es bei der Vorbehandlung mit Kaliumchlorid und Methoxamin zu beobachten war (Abb. 11 A, B; repeated measures ANOVA; $n=7$, $p<0,05$). Natrium-Nitroprussid (SNP) in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch Kaliumkanalblocker ohne XE991 erzeugte Kontraktion deutlich ab (Abb. 11 B). Dieser antikontraktile Effekt war im Vergleich zu demjenigen nach der Vorbehandlung der Gefäße mit 50 mM Kaliumchlorid deutlich stärker (Abb. 11 C).

Nach Vorkontraktion der Gefäße mit den genannten Kaliumkanalblockern unter Ausschluss von XE991 konnte bei der späteren Hinzugabe von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 eine deutliche Zunahme der Wandspannung detektiert werden, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 11 D). Die XE991-induzierte Zunahme der Kontraktion war in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid mit $56,0 \pm 2,3\%$ größer als in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid mit $32,7 \pm 3,7\%$ ($n=7$; $p<0,05$).

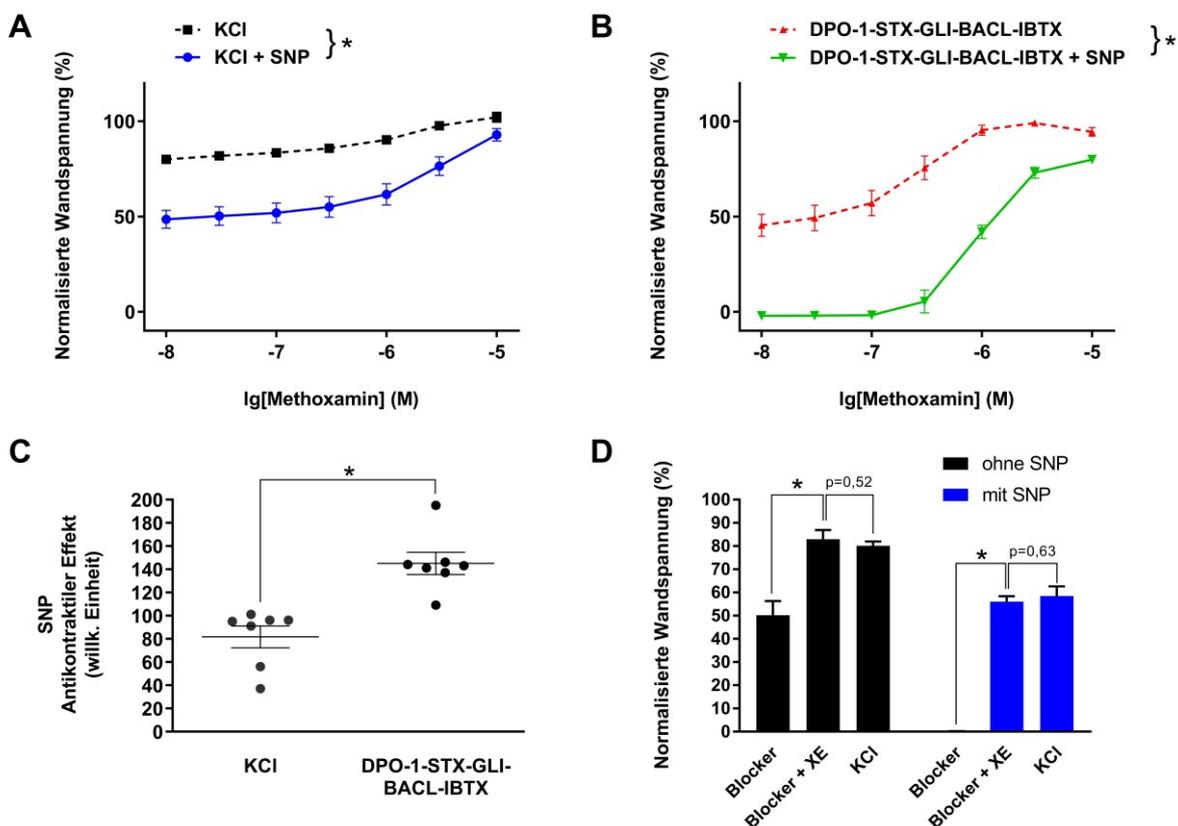


Abbildung 11: Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle außer des Kv_7 -Kanals

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und Kaliumchlorid in Abwesenheit (KCl) und Anwesenheit (KCl + SNP) von SNP 10^{-7} M (repeated measures ANOVA; $n=7$, * - $p<0,05$)
- B) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und der Kombination der Blockersubstanzen 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberiotoxin in Abwesenheit (DPO-1-STX-GLI-BACL-IBTX) und Anwesenheit von 10^{-7} M SNP (DPO-1-STX-GLI-BACL-IBTX + SNP) (repeated measures ANOVA; $n=7$, * - $p<0,05$)
- C) Antikontraktiler Effekt von 10^{-7} M SNP in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid (KCl) bzw. der Kanalblocker 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberiotoxin (DPO-1-STX-GLI-BACL-IBTX) (t-Test; $n=7$, * - $p<0,05$)
- D) Wandspannung der Gefäße, induziert durch die Kombination der Blockersubstanzen 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid, $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid und 10^{-7} M Iberiotoxin vor (Blocker) und nach Gabe von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 (Blocker + XE) in Abwesenheit (schwarze Balken) und Anwesenheit (blaue Balken) von SNP 10^{-7} M (t-Test; $n=7$, * - $p<0,05$)

3.7 Funktionelle Rolle des BK_{Ca} -Kanals

Auch in dieser Versuchsserie wurde ein von den Kaliumkanälen unabhängiger antikontraktiler Effekt des Stickstoffmonoxid-Donators Natrium Nitroprussid in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid beobachtet (Abb. 12 A).

Die Gabe der zuvor genannten Kaliumkanalblocker unter Ausschluss von Iberiotoxin und die zusätzliche Gabe von aufsteigenden Methoxamin-Konzentrationen kontrahierte die Arteriensegmente deutlich schwächer, als es bei der Vorbehandlung mit Kaliumchlorid und Methoxamin zu beobachten war (Abb. 12 A, B; repeated measures ANOVA; $n=8$, $p<0,05$). Natrium-Nitroprussid (SNP) in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch Kaliumkanalblocker ohne Iberiotoxin erzeugte Kontraktion deutlich ab (Abb. 12 B). Für diesen antikontraktilen Effekt konnte kein Unterschied zu demjenigen nach der Vorbehandlung der Gefäße mit 50 mM Kaliumchlorid detektiert werden (Abb. 12 C).

Nach Vorkontraktion der Gefäße mit den genannten Kaliumkanalblockern unter Ausschluss von Iberiotoxin konnte bei der späteren Hinzugabe von 10^{-7} M Iberiotoxin eine deutliche Zunahme der Wandspannung detektiert werden, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 12 D). Wir konnten keinen Unterschied in der Iberiotoxin-induzierten Zunahme der Kontraktion in Abwesenheit und Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid ($57,8 \pm 7,6\%$ bzw. $55,5 \pm 3,8\%$; $n=8$; $p=0,79$) detektieren.

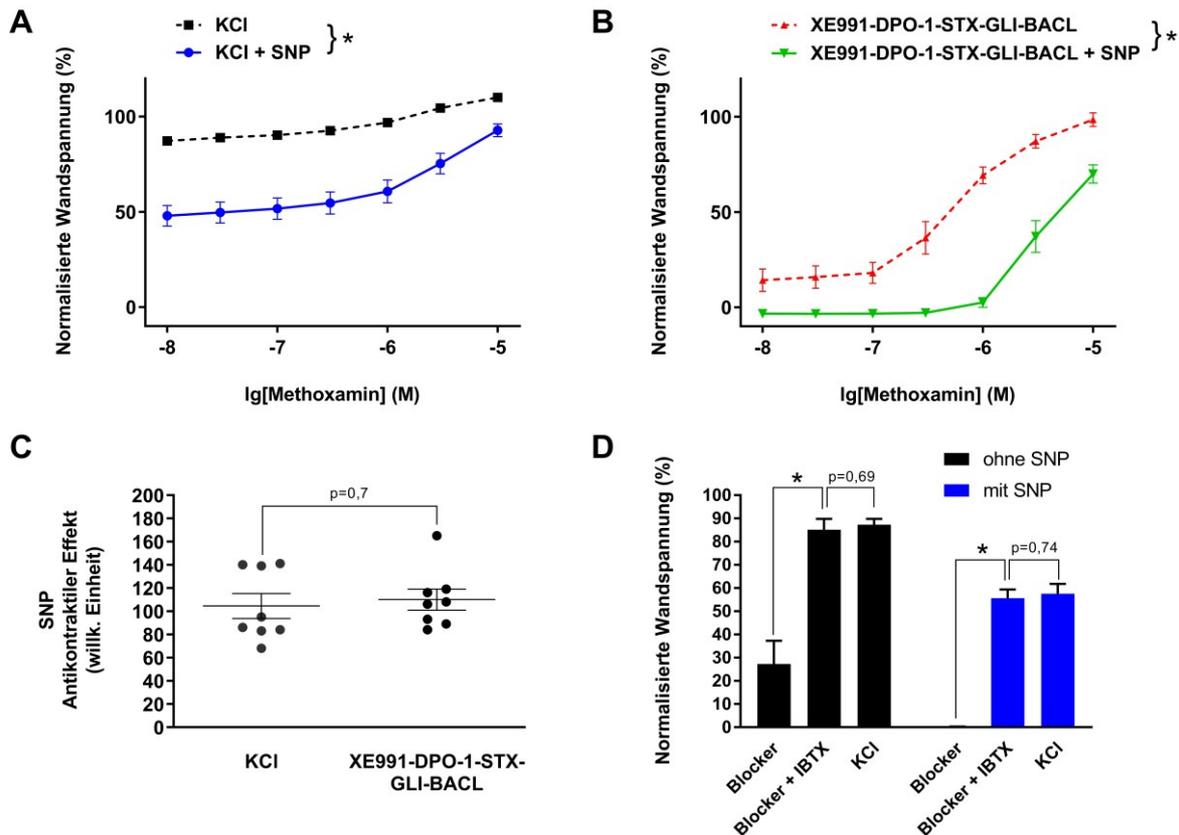


Abbildung 12: Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle außer des BK_{Ca} -Kanals

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und Kaliumchlorid in Abwesenheit (KCl) und Anwesenheit (KCl + SNP) von 10^{-7} M (repeated measures ANOVA; $n=8$, * - $p<0,05$)
- B) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin und der Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid und $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid in Abwesenheit (XE991-DPO-1-STX-GLI-BACL) und Anwesenheit von 10^{-7} M SNP (XE991-DPO-1-STX-GLI-BACL + SNP) (repeated measures ANOVA; $n=8$, * - $p<0,05$)
- C) Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP in Anwesenheit von 50 mM Kaliumchlorid (KCl) bzw. der Kanalblocker $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid und $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid (XE991-DPO-1-STX-GLI-BACL) (t-Test; $n=8$)
- D) Wandspannung der Gefäße, induziert durch die Kombination der Blockersubstanzen $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991, 10^{-6} M DPO-1, 10^{-7} M Stromatoxin, 10^{-6} M Glibenclamid und $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid vor (Blocker) und nach Gabe von 10^{-7} M Iberiotoxin (Blocker + IBTX) in Abwesenheit (schwarze Balken) und Anwesenheit (blaue Balken) von 10^{-7} M (t-Test; $n=8$, * - $p<0,05$)

3.8 Antikontraktile Wirkung von 10^{-8} M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von Kv_7 -Kanälen

Die funktionelle Ausschaltung der Kv_7 -Kanäle erfolgte durch XE991 in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M. XE991 in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M verstärkte die Methoxamin-induzierte Kontraktion (Abb. 13 A). Dies verdeutlicht den antikontraktile Wirkung der Kv_7 -Kanäle.

Bei Gabe von Natrium-Nitroprussid mit einer Konzentration von 10^{-8} M wurde keine Veränderung der durch Methoxamin induzierten Kontraktion detektiert (Abb. 13 A). Die Gabe von Natrium-Nitroprussid in Anwesenheit von XE991 erzeugte eine Abschwächung der Methoxamin-induzierten Kontraktion in Anwesenheit von XE991 (Abb. 13 A). XE991 führte somit zu einem Erscheinen einer Wirkung von Natrium-Nitroprussid (Abb. 13 B). Bei Gabe von XE991 in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid wurde keine Veränderung der durch Methoxamin induzierten Kontraktion in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid detektiert (Abb. 13 A). Damit hob Natrium-Nitroprussid die Wirkung von XE991 auf (Abb. 13 C).

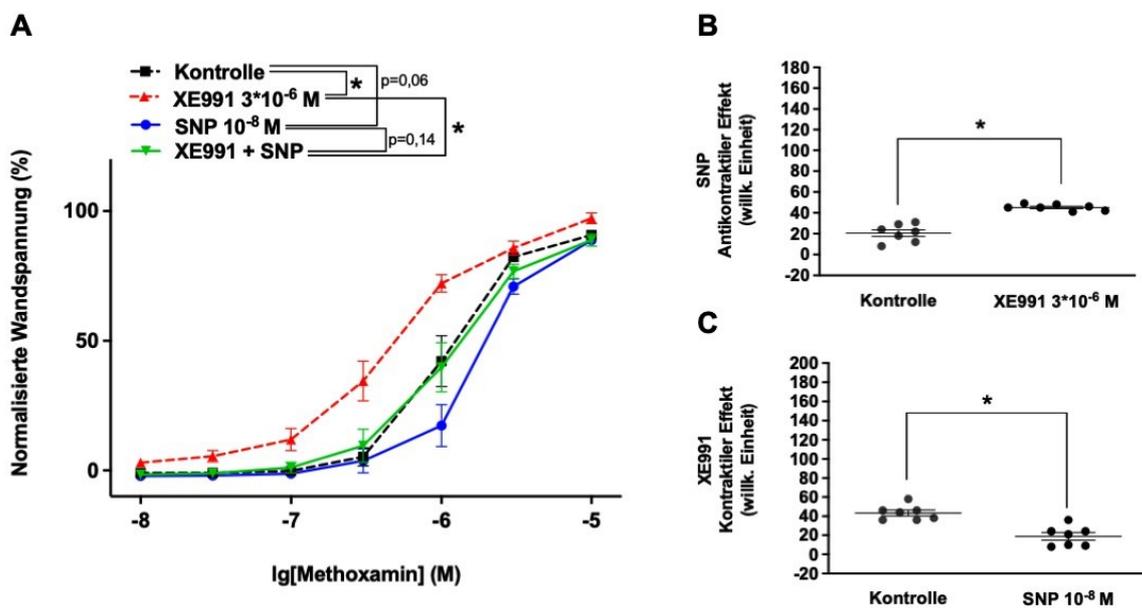


Abbildung 13: Antikontraktileffekt von 10^{-8} M SNP nach Blockade von Kv_7 -Kanälen

- Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin, in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle) und Anwesenheit von XE991 (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M), von SNP (SNP 10^{-8} M) und von XE991 zusammen mit SNP (XE991+ SNP) (repeated measures ANOVA; $n=7$, * - $p < 0,05$)
- Antikontraktileffekt von 10^{-8} M SNP in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (XE991) von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 (t-Test; $n=7$, * - $p < 0,05$)
- Kontraktileffekt von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (SNP) von 10^{-8} M SNP (t-Test; $n=7$, * - $p < 0,05$)

3.9 Antikontraktileffekt von 10^{-7} M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von Kv_7 -Kanälen

XE991 in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M verstärkte auch in dieser Versuchsserie die Methoxamin-induzierte Kontraktion (Abb. 14 A).

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid mit einer gesteigerten Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch Methoxamin induzierte Kontraktion ab (Abb. 14 A). Die Gabe von Natrium-Nitroprussid in Anwesenheit von XE991 erzeugte ebenfalls eine Abschwächung der Methoxamin-induzierten Kontraktion in Anwesenheit von XE991 (Abb. 14 A). XE991 verstärkte somit den Effekt von Natrium-Nitroprussid (Abb. 14 B). Bei Gabe von XE991 in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid wurde keine Veränderung der Methoxamin-induzierten Kontraktion in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid detektiert (Abb. 14 A). Damit hob Natrium-Nitroprussid die Wirkung von XE991 auf (Abb. 14 C).

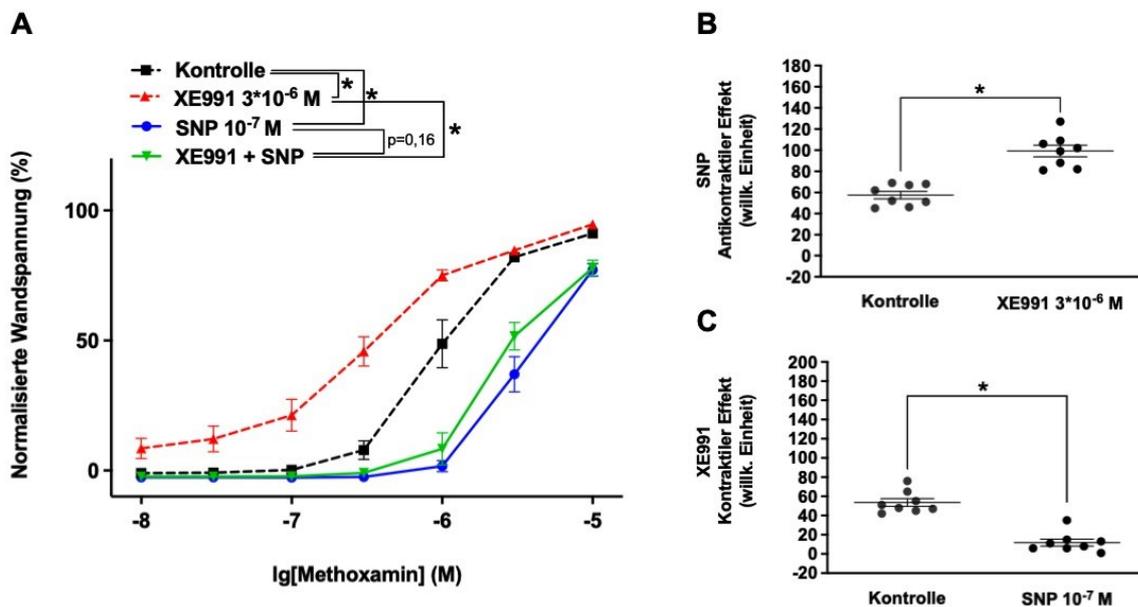


Abbildung 14: Antikontractiler Effekt von 10^{-7} M SNP nach Blockade von Kv_7 -Kanälen

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin, in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle) und Anwesenheit von XE991 ($3 \cdot 10^{-6}$ M), von SNP (10^{-7} M) und von XE991 zusammen mit SNP (XE991 + SNP) (repeated measures ANOVA; $n=8$, * - $p < 0,05$)
- B) Antikontractiler Effekt von 10^{-7} M SNP in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (XE991) von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 (t-Test; $n=8$, * - $p < 0,05$)
- C) Kontractiler Effekt von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (SNP) von 10^{-7} M SNP (t-Test; $n=8$, * - $p < 0,05$)

3.10 Antikontractiler Effekt von 10^{-8} M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von Kv_7 - und BK_{Ca} -Kanälen

Die funktionelle Ausschaltung der Kv_7 -Kanäle erfolgte durch XE991 in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M, die der BK_{Ca} -Kanäle durch Iberiotoxin in einer Konzentration von 10^{-7} M. XE991 in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M und Iberiotoxin in einer Konzentration von 10^{-7} M verstärkten die Methoxamin-induzierte Kontraktion

(Abb. 15 A). Dies verdeutlicht den antikontraktilen Effekt sowohl der Kv_7 - als auch der BK_{Ca} -Kanäle.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid mit einer Konzentration von 10^{-8} M schwächte die durch Methoxamin induzierte Kontraktion ab (Abb. 15 A). Auch die Gabe von Natrium-Nitroprussid in Anwesenheit von XE991 und Iberiotoxin erzeugte eine Abschwächung der Methoxamin-induzierten Kontraktion in Anwesenheit von XE991 und Iberiotoxin (Abb. 15 A). XE991 und Iberiotoxin verstärkten den Effekt von Natrium-Nitroprussid (Abb. 15 B). Die Gabe von XE991 und Iberiotoxin in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid verstärkte die Methoxamin-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 15 A). Es konnte keine Wirkung von Natrium-Nitroprussid auf den Effekt von XE991 und Iberiotoxin detektiert werden (Abb. 15 C).

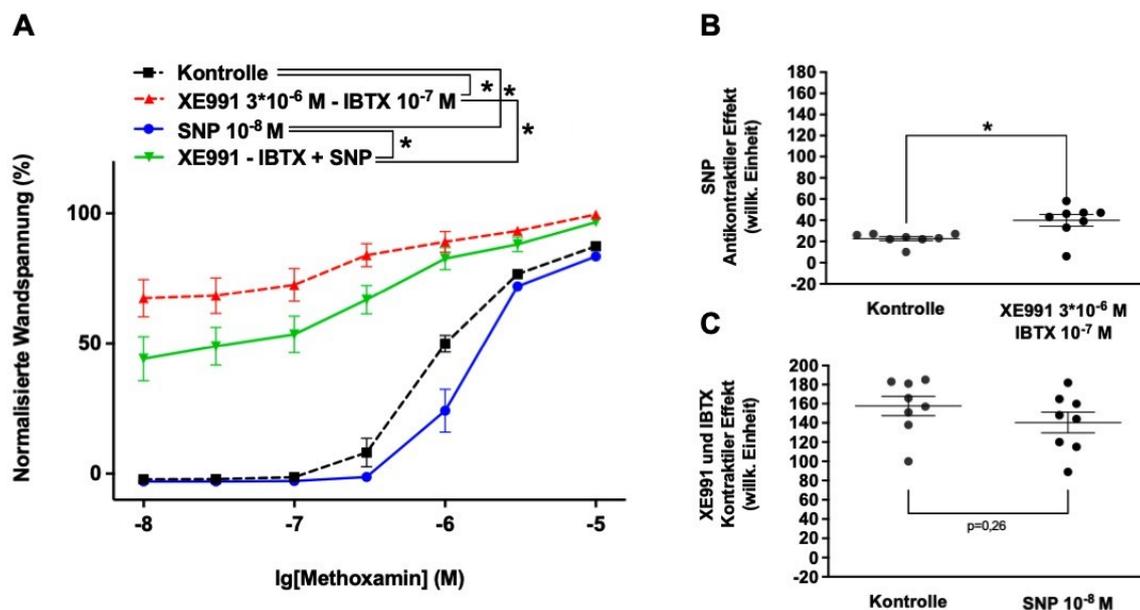


Abbildung 15: Antikontraktile Effekt von 10^{-8} M SNP nach Blockade von Kv_7 - und BK_{Ca} -Kanälen

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin, in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle) und Anwesenheit von XE991 und Iberiotoxin (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M), von SNP (SNP 10^{-8} M) und von XE991 und Iberiotoxin zusammen mit SNP (XE991 - IBTX + SNP) (repeated measures ANOVA; n=8, * - $p < 0,05$)
- B) Antikontraktile Effekt von 10^{-8} M SNP in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (XE991 + IBTX) von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 und 10^{-7} M IBTX (t-Test; n=8, * - $p < 0,05$)
- C) Kontraktile Effekt von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 und 10^{-7} M IBTX in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (SNP) von 10^{-8} M SNP (t-Test; n=8)

3.11 Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von Kv_7 - und BK_{Ca} -Kanälen

XE991 in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-6}$ M und Iberitotoxin in einer Konzentration von 10^{-7} M verstärkten auch in dieser Versuchsserie die Methoxamin-induzierte Kontraktion (Abb. 16 A).

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid mit einer gesteigerten Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch Methoxamin induzierte Kontraktion ab (Abb. 16 A). Auch die Gabe von Natrium-Nitroprussid in Anwesenheit von XE991 und Iberitotoxin erzeugte eine Abschwächung der Methoxamin-induzierten Kontraktion in Anwesenheit von XE991 und Iberitotoxin (Abb. 16 A). XE991 und Iberitotoxin verstärkten den Effekt von Natrium-Nitroprussid (Abb. 16 B). Die Gabe von XE991 und Iberitotoxin in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid verstärkte die Methoxamin-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 16 A). Natrium-Nitroprussid schwächte die Wirkung von XE991 und Iberitotoxin ab (Abb. 16 C).

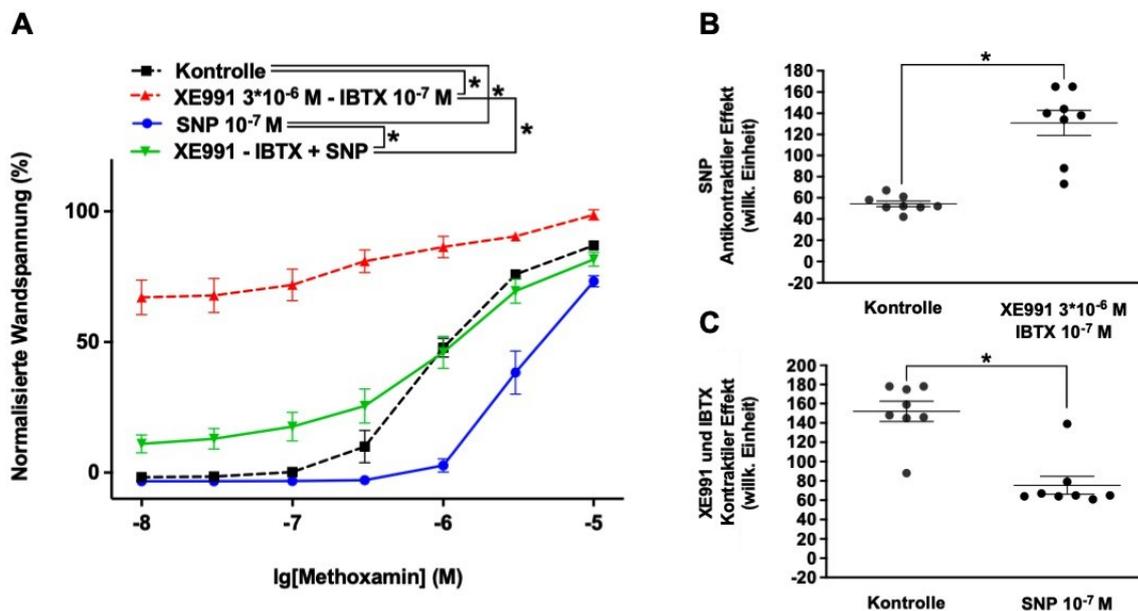


Abbildung 16: Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP nach Blockade von Kv_7 - und BK_{Ca} -Kanälen

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin, in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle) und Anwesenheit von XE991 und Iberitotoxin (XE991 $3 \cdot 10^{-6}$ M + IBTX 10^{-7} M), von SNP (SNP 10^{-7} M) und von XE991 und Iberitotoxin zusammen mit SNP (XE991 - IBTX + SNP) (repeated measures ANOVA; n=8, * - p<0,05)
- B) Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (XE991 + IBTX) von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 und 10^{-7} M IBTX (t-Test; n=8, * - p<0,05)
- C) Kontraktile Wirkung von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 und 10^{-7} M IBTX in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (SNP) von 10^{-7} M SNP (t-Test; n=8, * - p<0,05)

3.12 Antikontraktile Wirkung von 10^{-8} M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von BK_{Ca} -Kanälen

Die funktionelle Ausschaltung der BK_{Ca} -Kanäle erfolgte durch Iberiotoxin in einer Konzentration von 10^{-7} M. Iberiotoxin in einer Konzentration von 10^{-7} M verstärkte die Methoxamin-induzierte Kontraktion (Abb. 17 A). Dies verdeutlicht den antikontraktile Effekt der BK_{Ca} -Kanäle.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid mit einer Konzentration von 10^{-8} M schwächte die durch Methoxamin induzierte Kontraktion ab (Abb. 17 A). Auch die Gabe von Natrium-Nitroprussid in Anwesenheit von Iberiotoxin erzeugte eine Abschwächung der Methoxamin-induzierten Kontraktion in Anwesenheit von Iberiotoxin (Abb. 17 A). Iberiotoxin verstärkte den Effekt von Natrium-Nitroprussid (Abb. 17 B). Die Gabe von Iberiotoxin in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid verstärkte die Methoxamin-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 17 A). Natrium-Nitroprussid schwächte die Wirkung von Iberiotoxin ab (Abb. 17 C).

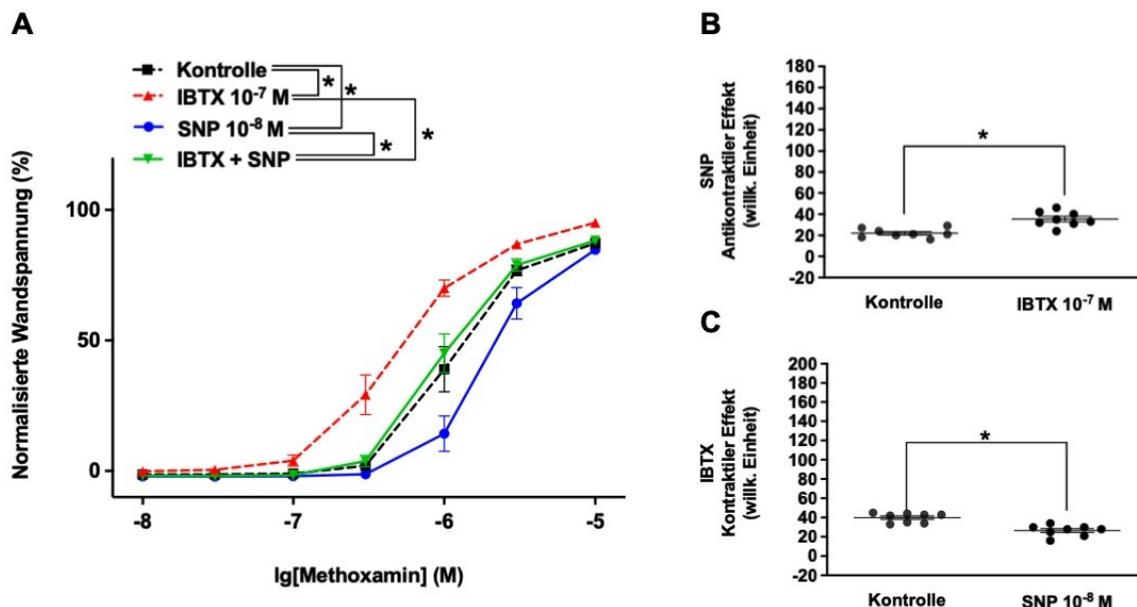


Abbildung 17: Antikontraktile Wirkung von 10^{-8} M SNP nach Blockade von BK_{Ca} -Kanälen

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin, in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle) und Anwesenheit von IBTX (IBTX 10^{-7} M), von SNP (SNP 10^{-8} M) und von IBTX zusammen mit SNP (IBTX + SNP) (repeated measures ANOVA; $n=8$, * - $p<0,05$)
- B) Antikontraktile Wirkung von 10^{-8} M SNP in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (IBTX) von 10^{-7} M Iberiotoxin (t-Test; $n=8$, * - $p<0,05$)
- C) Kontraktile Wirkung von 10^{-7} M IBTX in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (SNP) von 10^{-8} M SNP (t-Test; $n=8$, * - $p<0,05$)

3.13 Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade von BK_{Ca} -Kanälen

Iberitoxin in einer Konzentration von 10^{-7} M verstärkte auch in dieser Versuchsserie die Methoxamin-induzierte Kontraktion (Abb. 18 A). Dies verdeutlicht den antikontraktilen Effekt der BK_{Ca} -Kanäle.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid mit einer gesteigerten Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch Methoxamin induzierte Kontraktion ab (Abb. 18 A). Auch die Gabe von Natrium-Nitroprussid in Anwesenheit von Iberitoxin erzeugte eine Abschwächung der Methoxamin-induzierten Kontraktion in Anwesenheit von Iberitoxin (Abb. 18 A). Iberitoxin verstärkte den Effekt von Natrium-Nitroprussid (Abb. 18 B). Die Gabe von Iberitoxin in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid verstärkte die Methoxamin-induzierte Kontraktion in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (Abb. 18 A). Natrium-Nitroprussid schwächte die Wirkung von Iberitoxin ab (Abb. 18 C).

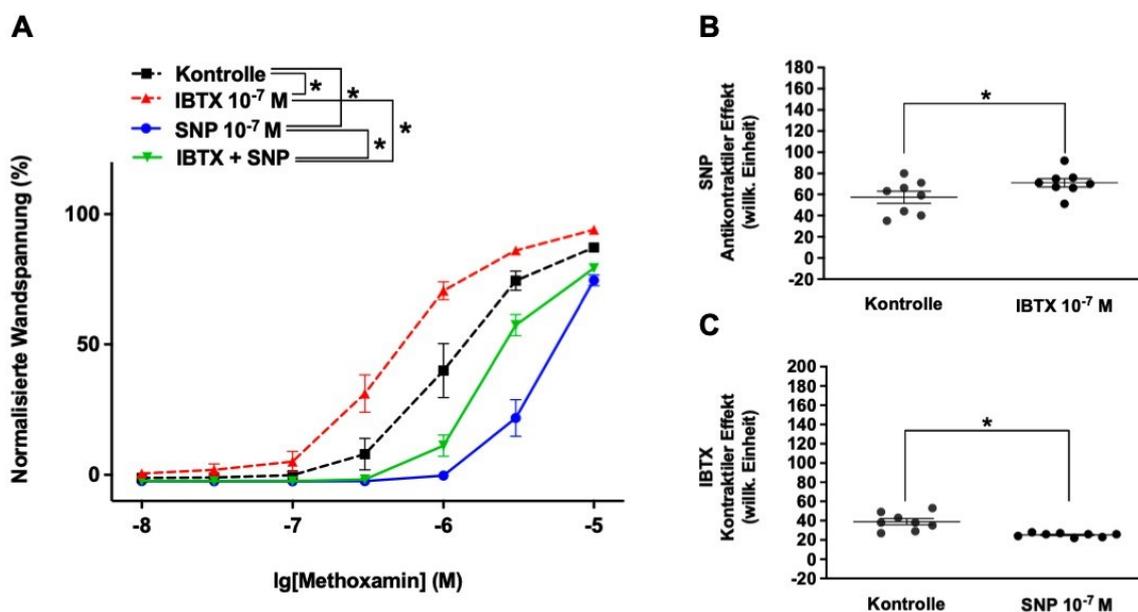


Abbildung 18: Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP nach Blockade von BK_{Ca} -Kanälen

- A) Wandspannung der Gefäße, induziert durch Methoxamin, in Abwesenheit aller Substanzen (Kontrolle) und Anwesenheit von IBTX (IBTX 10^{-7} M), von SNP (SNP 10^{-7} M) und von IBTX zusammen mit SNP (IBTX + SNP) (repeated measures ANOVA; n=8, * - p<0,05)
- B) Antikontraktile Wirkung von 10^{-7} M SNP in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (IBTX) von 10^{-7} M Iberitoxin (t-Test; n=8)
- C) Kontraktile Wirkung von 10^{-7} M IBTX in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit (SNP) von 10^{-7} M SNP (t-Test; n=8, * - p<0,05)

4 DISKUSSION

4.1 Kritische Methodenbetrachtung und Limitationen dieser Studie

Die Beteiligung von Kaliumkanälen an der durch Natrium-Nitroprussid (SNP) induzierten Gefäßrelaxation wurde in der vorliegenden Studie am Beispiel der Arteria saphena der Wistar Ratte mittels Multiwire Myographie (Details siehe Abschnitt 2.3) untersucht. Zum Ausschluss hormoneller Einflüsse wurden hierzu ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet. Zukünftige Studien sollten sich jedoch unbedingt auch der Frage zuwenden, wie diese Mechanismen in weiblichen Tieren funktionieren.

Die Kleingefäßmyographie (Mulvany und Halpern, 1976) ermöglicht die pharmakologischen, mechanischen und morphologischen Eigenschaften isolierter Arterien-segmente unter isometrischen Bedingungen (konstanter Gefäßdurchmesser) zu untersuchen. In den vier separierten Organbädern konnten für die isolierten Arterien-segmente physiologische Bedingungen simuliert werden. Das Einstellen eines optimalen inneren Umfangs (Details zur Normalisierung siehe Abschnitt 2.3.3) standardisierte die Ausgangswerte und optimierte die jeweilige Gefäßantwort. Vier Segmente einer isolierten Arterie konnten simultan und unterdessen individuell mit unterschiedlichen Variationen von vasoaktiven Substanzen untersucht werden. In den Organbädern hatten die Gefäßsegmente unmittelbaren Kontakt mit den applizierten vasoaktiven Substanzen. Die Wirkstoffe konnten somit nicht für vergleichende Untersuchungen von entweder intra- oder extraluminal angeboten werden. Der aus der Interaktion mit diesen Substanzen resultierende Kontraktionszustand der Gefäßsegmente wurde indirekt über Veränderungen der Wandspannung ermittelt.

Die Kleingefäßmyographie eignet sich ideal für In-vitro-Studien, wie die hier vorliegende Studie, die simultan das isometrische Kontraktions- wie auch Relaxationsverhalten kleinerer Arterien als Antwort auf die Gabe vasoaktiver Substanzen mittels sich wiederholender Konzentrations-Wirkungsbeziehungen (DWK) untersuchen möchte.

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde jedoch nur ein Gefäß einer einzelnen Spezies und dies auch nur mittels der im letzten Absatz beschriebenen wissenschaftlichen Methode untersucht. Daher bleibt unklar, ob die Ergebnisse auch auf andere Gefäße, Spezies oder gar den Menschen übertragen werden können. Zukünftige Studien sollten die hier verwendeten Versuchsprotokolle auf andere

Gefäße bzw. Spezies anwenden, um zu prüfen, ob ähnliche Ergebnisse detektiert werden können.

Die Auswirkungen von Stickstoffmonoxid auf die untersuchten Kaliumkanäle wurden nur mit dem Stickstoffmonoxid-Donator Natrium-Nitroprussid (SNP) untersucht, der nicht-enzymatisch Stickstoffmonoxid in den Extrazellularraum freisetzt. Der Einfluss von endotheliale Stickstoffmonoxid wurde durch die Entfernung des Endothels (Details siehe Abschnitt 2.3.2) bewusst ausgeschaltet.

In den vorgelegten Untersuchungen wird davon ausgegangen, dass die Wirkung von Natrium-Nitroprussid durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt wird. Dafür spricht, dass in ähnlichen Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass durch NO-Fänger wie Hydroxycobolamin und durch die Hemmung der Guanylatzyklase mittels ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) der antikontraktile Effekt von Natrium-Nitroprussid vollständig aufgehoben werden konnte. Durch die Hemmung der Proteinkinase G mittels Rp-8-Br- PET-cGMPS gelang dies zumindest teilweise. Diese Feststellungen legen ebenso nahe, dass Stickstoffmonoxid seine Wirkung vor allem über den NO/sGC/PKG-Signalweg vermittelt. Gagov et. al konnten am Beispiel des BK_{Ca}-Kanal aufzeigen, dass dieser vor allem über die Proteinkinase G aktiviert wird. Für Cyanid, welches als Nebenprodukt bei der NO-Freisetzung aus Natrium-Nitroprussid entstehen kann, konnte keine Beteiligung am antikontraktilen Effekt aufgezeigt werden, da dessen Inaktivierung durch die Schwefeltransferase Rhodanase und das Salz Natriumthiosulfat den antikontraktilen Effekt von Natrium-Nitroprussid nicht beeinflusste (Butt et al., 1995; Feelisch, 1998; Gagov et al., 2022; Garthwaite et al., 1995; Kruszyna et al., 1998; Schmid et al., 2018; Schubert et al., 2004).

In dieser Studie wurde nicht geprüft, ob Stickstoffmonoxid vor allem eine direkte oder indirekte Wirkung über den NO/cGMP/PKG-Signalweg auf die untersuchten Kaliumkanäle ausübt. Zudem fand kein Vergleich unterschiedlicher Stickstoffmonoxid-Donatoren statt. Es bleibt daher zu klären, ob sich die in dieser Studie präsentierten Ergebnisse durch andere NO-Donatoren bestätigen lassen. Zukünftige Studien sollten sich diesen Fragestellungen zuwenden.

Im Zentrum der beobachteten Gefäßrelaxation stand die Annahme, dass, vermittelt durch Stickstoffmonoxid (NO), Kaliumkanäle aktiviert werden und dies durch die Hyperpolarisation der glattmuskulären Zellmembran ein Absinken der intrazellulären Calciumkonzentration induziert und schließlich eine Gefäßrelaxation bedingt (Chen und Rembold, 1996; Karaki et al., 1988). Messungen des Membranpotentials bzw. des Calciumspiegels wurden jedoch im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt.

Zukünftige Versuchsprotokolle sollten diese Messungen berücksichtigen. Die intrazelluläre Calciumkonzentration kann bspw. photometrisch bestimmt werden, wie bereits durch Schmid et al. demonstriert wurde (Schmid et al., 2018). Das Membranpotential kann mittels scharfer Mikroelektroden in isolierten Gefäßen gemessen werden (Gagov et al., 2022).

Aus Tierschutzgründen und wie bei vielen anderen zeitintensiven experimentellen Untersuchungen blieb die Anzahl der verwertbaren Experimente pro Versuchsreihe relativ gering (n im Bereich von 6 bis 10). Da die angewandten t-Tests bei der Berechnung der statischen Signifikanz jedoch direkt von der Stichprobengröße abhängig sind, werden so kleinere Effekte gegebenenfalls verschleiert. Allerdings ist davon auszugehen, dass solche kleinen Effekte zwar statistisch nachweisbar wären, jedoch keine funktionelle Relevanz haben.

4.2 Antikontraktiler Effekt von Natrium-Nitroprussid (SNP) nach Blockade aller untersuchten Kaliumkanäle

In dieser Versuchsreihe erfolgte die funktionelle Ausschaltung aller bisher in glatten Muskelzellen funktionell in Erscheinung getretenen und untersuchten Kaliumkanäle (Goldstein et al., 2001; Nelson und Quayle, 1995; Tykocki et al., 2017a) durch die Applikation der entsprechenden spezifischen Kaliumkanalblocker wie in Abschnitt 3.1 im Detail dargestellt. Die resultierende Zunahme der normalisierten Wandspannung konnte anschließend konzentrationsabhängig durch den α 1-Adrenorezeptoragonisten Methoxamin (Trendelenburg et al., 1970) weiter gesteigert werden.

Eine ähnliche Zunahme der Wandspannung konnte durch die Vorbehandlung der Gefäßsegmente mit 50 mM Kaliumchlorid und Methoxamin erzielt werden. Kaliumchlorid steigerte die extrazelluläre Konzentration der Kaliumionen (durch äquimolare Reduktion der extrazellulären Konzentration der Natriumionen), so dass

der elektrochemische Gradient für Kalium stark reduziert wurde und selbst durch geöffnete Kaliumkanäle keine Beeinflussung des Membranpotentials mehr stattfinden konnte. Damit sind alle Kaliumkanäle funktionell ausgeschaltet, auch ohne die Anwendung der oben genannten Blockersubstanzen.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte sowohl die Kontraktion der mit den spezifischen Kaliumkanalblockern als auch der mit Kaliumchlorid vorbehandelten Gefäßsegmente deutlich ab. Es konnte hierbei kein Unterschied zwischen diesen beiden Bedingungen in Bezug auf den antikontraktilen Effekt von Natrium-Nitroprussid nachgewiesen werden. Die Abschwächung der Kontraktion im Rahmen der Vorbehandlung der Gefäßsegmente mit Kaliumchlorid stellt den von Kaliumkanälen unabhängigen antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxid-Donators dar.

Diese Versuchsreihe verdeutlicht, dass Natrium-Nitroprussid (SNP) unabhängig vom Endothel (es erfolgte dessen Entfernung bei der Gefäßpräparation – siehe Abschnitt 2.3.2) als auch von Kaliumkanälen einen antikontraktilen Effekt aufweist. Dieser beruht auf der nicht-enzymatischen Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Feelisch, 1998; Schmid et al., 2018; Schubert et al., 2004). Viele Studien konnten zeigen, dass die NO-induzierte Gefäßrelaxation mehrheitlich über den sGC/cGMP/PKG-Signalweg vermittelt wird (Andriantsitohaina et al., 1995; Bates et al., 1991; Francis et al., 2010; Miller und Megson, 2007; Miller et al., 2004; Schmid et al., 2018).

Die Gefäßrelaxation kann über die Erniedrigung des glattmuskulären Calciumspiegels bewirkt werden. Hierzu wird die Freisetzung von Calcium gehemmt bzw. dessen Wiederaufnahme mittels ATP-abhängiger Calciumpumpe in das sarkoplasmatische Retikulum gefördert (Andriantsitohaina et al., 1995). Die Calciumfreisetzung wird ebenso über eine Reduktion der Bildung des Second Messenger Inositoltrisphosphat (IP_3) bzw. die Phosphorylierung des zugehörigen Rezeptors gedrosselt (Komalavilas und Lincoln, 1996; Ruth et al., 1993). Eine weitere Möglichkeit der Calciumreduktion besteht in der Aktivierung von Calcium-ATPasen bzw. Natrium-Calcium-Austauschern der glattmuskulären Plasmamembran (Furukawa et al., 1991; Webb, 2003).

Unabhängig vom Abfall des intrazellulären Calciumspiegels ist eine Gefäßrelaxation andererseits durch die Reduktion der Calcium-Sensitivität des kontraktilen Apparates möglich. Hierbei verlagert sich das Gleichgewicht zwischen den antagonistisch

arbeitenden Enzymen Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) hin zur Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP). Die cGMP-vermittelte Aktivitätssteigerung der Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) bedingt die Dephosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins, mindert damit die Interaktion zwischen den Myofilamenten Aktin und Myosin ohne Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration und führt in dessen Folge ebenso zur Gefäßrelaxation (Webb, 2003; Wu et al., 1996).

Durch diese Versuchsreihe wurde aufgezeigt, dass Natrium-Nitroprussid auch einen von den untersuchten Kaliumkanälen unabhängigen antikontraktilen Effekt aufweist. Um die Beteiligung einzelner Kaliumkanäle aufzuzeigen, erfolgte in den nachfolgenden Versuchsreihen immer ein Vergleich mit der oben beschriebenen, von Kaliumkanälen unabhängigen Wirkung von Natrium-Nitroprussid nach Vorkontraktion mit Kaliumchlorid und durch Blockierung aller Kaliumkanäle außer des zu untersuchenden Kanals.

4.2.1 Funktionelle Rolle des Kir₆-Kanals

Die funktionelle Blockade aller Kaliumkanäle unter Belassen des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) zeigte, wie bei der funktionellen Ausschaltung aller untersuchten Kaliumkanäle, eine deutliche Zunahme der Wandspannung. Diese war von der Wandspannung nach Vorbehandlung der Gefäßsegmente mit 50 mM Kaliumchlorid nicht zu unterscheiden. Im Rahmen der späteren Hinzugabe von 10⁻⁶ M Glibenclamid zur spezifischen Blockade des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) konnte keine weitere Zunahme der Blocker-induzierten Kontraktion detektiert werden. Das spricht dafür, dass dieser Kanal unter den gewählten Bedingungen funktionell nicht aktiv ist.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10⁻⁷ M schwächte die durch die Kanalblocker unter Ausschluss von Glibenclamid erzeugte Kontraktion deutlich ab. Es konnte kein Unterschied der Abschwächung der Kontraktion im Vergleich zur Vorbehandlung der Gefäße mit Kaliumchlorid detektiert werden. Auch durch die Gabe von 10⁻⁶ M Glibenclamid in Anwesenheit der anderen Kanalblocker und von Natrium-Nitroprussid konnte keine Veränderung der Wandspannung detektiert werden. Damit konnte auch in diesem Kontext kein antikontraktiler Effekt für den Kir₆-Kanal (K_{ATP}) in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid nachgewiesen werden.

Eine funktionelle Inaktivität des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid wurde auch in anderen Untersuchungen gefunden. Diese zeigen auf, dass Kir₆-Kanäle in vielen Gefäßbetten (bspw. in Widerstandsgefäßen der Skelettmuskulatur) auf Grund ihrer geringen Dichte, der meist niedrigen Leitfähigkeit und bei Abwesenheit äußerer Stimuli wenig Aktivität und folglich wenig Einfluss auf das Membranpotential und den vaskulären Tonus ausüben. Diese Feststellungen beruhen auf der Beobachtung, dass Glibenclamid keinerlei Effekte induzierte. Einfluss auf den basalen Tonus werde vielmehr durch vasodilatierende Stimuli wie endogene Signalmoleküle (bspw. Adenosin oder Prostacyclin), Hypoxie oder Azidose vermittelt, die eine Aktivierung des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) bedingen (Banitt et al., 1996; Dart und Standen, 1993; Faraci und Sobey, 1998; Jackson et al., 1993; Minkes et al., 1995; Nelson und Quayle, 1995; Quayle et al., 1997; Sobey, 2001; Thomas et al., 1997; Tykocki et al., 2017a; Vallet et al., 1995).

Der ausbleibende antikontraktile Effekts des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid wurde ebenso in andere Untersuchungen beschrieben. Studien am Kaninchenherz (Jackson et al., 1993) sowie an Mesenterialgefäßen von Kaninchen (Khan et al., 1993) wie auch Mäusen (Mustafa et al., 2011) konnten keine Beteiligung des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) am NO/cGMP/PKG-Signalweg nachweisen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Versuchsreihe und den im letzten Absatz zitierten Untersuchungen konnte durch andere Studien eine Beteiligung des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) am vaskulären Ruhetonus und Blutfluss gezeigt werden. Tykocki und Jackson führen in ihren Reviews zahlreiche Studien auf, denen dieser Nachweis im Gefäßgebiet der Koronarien, der Haut, der Niere, viszeraler Gefäße aber auch in Widerstandsgefäßen der Skelettmuskulatur unterschiedlicher Spezies gelang (Abbink et al., 2002; Duncker et al., 2001; Imamura et al., 1992; Jackson, 2000; Samaha et al., 1992; Tykocki et al., 2017a; Vanelli et al., 1994). Ebenso wurde gezeigt, dass Glibenclamid als selektiver Blocker des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) eine Vasokonstriktion in verschiedene Gefäßregionen vermitteln kann (Jackson, 1993, 2000; Jackson et al., 1993; Saito et al., 1996; Tateishi und Faber, 1995; Tykocki et al., 2017a; Vanelli et al., 1994; Vanelli und Hussain, 1994). Diese Heterogenität der Ergebnisse setzt sich bezüglich der Beteiligung des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) am NO/sGC/PKG-Signalweg (Details zum Signalweg siehe Abschnitt 1.5) fort. Einige Untersuchungen zeigten auf, dass

über Stickstoffmonoxid (NO) eine Kanalaktivierung und in dessen Konsequenz eine Hyperpolarisation mit konsekutiver Gefäßrelaxation bspw. an Mesenterialgefäßen von Kaninchen und Ratten und Koronarien von Schweinen induziert werden kann (Miyoshi et al., 1994; Murphy und Brayden, 1995; Nelson und Quayle, 1995; Quayle et al., 1997; Standen et al., 1989; Wu et al., 2004).

In der hier vorgelegten Versuchsreihe gelang kein Nachweis einer Beteiligung des Kir₆-Kanals (K_{ATP}) am antikontraktiven Effekt des Stickstoffmonoxids. Dieses Ergebnis steht im Konsens als auch Dissens mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen. Die Ursachen dieser unterschiedlichen Befunde bleiben bislang ungeklärt und beruhen möglicherweise auf Unterschieden in der gewählten Methodik. Aber auch die Auswahl der untersuchten Gefäßregion bzw. der untersuchten Spezies könnte die Interaktion zwischen Kir₆-Kanals (K_{ATP}) und dem gefäßrelaxierenden NO/sGC/PKG-Signalweg modulieren. Die Ursachenklärung dieser Heterogenität sollte Ziel zukünftiger Studien sein.

4.2.2 Funktionelle Rolle des Kir₂-Kanals

Die funktionelle Blockade aller Kaliumkanäle unter Belassen des Kir₂-Kanals zeigte, wie bei der funktionellen Ausschaltung aller untersuchten Kaliumkanäle, eine deutliche Zunahme der Wandspannung. Diese war von der Wandspannung nach Vorbehandlung der Gefäßsegmente mit 50 mM Kaliumchlorid nicht zu unterscheiden. Im Rahmen der späteren Hinzugabe von $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid zur spezifischen Blockade des Kir₂-Kanals konnte keine weitere Zunahme der Blocker-induzierten Kontraktion detektiert werden. Das spricht dafür, dass dieser Kanal unter den gewählten Bedingungen funktionell nicht aktiv ist.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch die Kanalblocker unter Ausschluss von Bariumchlorid erzeugte Kontraktion deutlich ab. Es konnte kein Unterschied der Abschwächung der Kontraktion im Vergleich zur Vorbehandlung der Gefäße mit Kaliumchlorid detektiert werden. Auch nach Gabe von $3 \cdot 10^{-5}$ M Bariumchlorid in Anwesenheit der anderen Kanalblocker und von Natrium-Nitroprussid konnte keine Veränderung der Wandspannung detektiert werden. Damit konnte auch in diesem Kontext kein antikontraktiler Effekt für den Kir₂-Kanal in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid nachgewiesen werden.

Eine funktionelle Inaktivität des Kir₂-Kanals in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid wurde auch in einigen anderen Untersuchungen gefunden. Diese zeigen auf, dass Kir₂-Kanäle im Bereich der Cerebralarterien sowie der Koronarien der weiblichen Ratte nur wenig Effekt auf das Ruhemembranpotential bzw. den Gefäßdurchmesser ausüben (Knot et al., 1996). Ein wie in der vorliegenden Studie vollständig fehlender Effekt von Barium auf den Ruhetonus wurde an Koronarien von Schweinen sowie an parenchymalen Arterien von Hirnschnitten der Ratte nachgewiesen (Filosa et al., 2006; Rivers et al., 2001). Der ausbleibende antikontraktile Effekt des Kir₂-Kanals in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht durch andere Untersuchungen bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Versuchsreihe und den im letzten Absatz zitierten Studien, zeigen die meisten Untersuchungen des Kir₂-Kanal auf, dass dieser Kaliumkanal eine basale Aktivität auch bereits unter Ruhebedingungen aufweist. Eine spezifische Blockade mittels Barium löste in zahlreichen Gefäßbetten eine Depolarisation sowie Kontraktion glatter Muskelzellen aus. Dieser Nachweis gelang an cerebralen, koronaren, renalen und hepatischen Gefäßen von männlichen und von weiblichen Ratten sowie an submukösen Arteriolen des männlichen Meer-schweinchens wie auch an Arteriolen des Musculus cremaster des Hamsters (Burns et al., 2004; Chilton et al., 2011; Edwards und Hirst, 1988; Edwards et al., 1988; Edwards et al., 1998; McCarron und Halpern, 1990; Prior et al., 1998a; Quayle et al., 1996; Quayle et al., 1993; Robertson et al., 1996; Schubert et al., 2004; Smith et al., 2008; Sobey, 2001; Tykocki et al., 2017a).

Schubert et al. zeigten am Beispiel der kleinen Schwanzarterie der Ratte auf, dass Stickstoffmonoxid (NO), freigesetzt aus Natrium-Nitroprussid (SNP), eine Aktivierung des Kir₂-Kanal über den NO/sGC/PKG-Signalweg (Details zum Signalweg siehe Abschnitt 1.5) und in dessen Konsequenz eine Gefäßrelaxation induzieren kann. Barium zur spezifischen Blockade des Kir₂-Kanals schwächte die SNP-induzierte Gefäßrelaxation ab (Schubert et al., 2004). Der Nachweis, dass Stickstoffmonoxid den Kir₂-Kanal aktivieren kann, gelang ebenfalls an den Arteriolen von Schweinen – hier blieb jedoch der genaue Signalweg ungeklärt (Hein et al., 2013; Tykocki et al., 2017a).

In der hier vorgelegten Versuchsreihe gelang kein Nachweis einer Beteiligung des Kir₂-Kanals am antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO). Die Ursachen dieser

unterschiedlichen Befunde bleiben bislang ungeklärt und beruhen möglicherweise auf Unterschieden in der gewählten Methodik. Insgesamt liegen jedoch zu wenig Untersuchungen aus anderen Gefäßbetten bzw. Spezies vor, die die Interaktion zwischen Stickstoffmonoxid (vermittelt über den NO/sGC/PKG-Signalweg) und dem Kir₂-Kanal abschließend klären könnten. Hierauf sollten sich zukünftige Studien fokussieren.

4.2.3 Funktionelle Rolle des Kv₁-Kanals

Die funktionelle Blockade aller Kaliumkanäle unter Belassen des Kv_{1.5}-Kanals zeigte, wie bei der funktionellen Ausschaltung aller untersuchten Kaliumkanäle, eine deutliche Zunahme der Wandspannung. Diese war von der Wandspannung nach Vorbehandlung der Gefäßsegmente mit 50 mM Kaliumchlorid nicht zu unterscheiden. Im Rahmen der späteren Hinzugabe von 10⁻⁶ M DPO-1 zur spezifischen Blockade des Kv_{1.5}-Kanals konnte keine weitere Zunahme der Blocker-induzierten Kontraktion detektiert werden. Das spricht dafür, dass dieser Kanal unter den gewählten Bedingungen funktionell nicht aktiv ist.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10⁻⁷ M schwächte die durch die Kanalblocker unter Ausschluss von DPO-1 erzeugte Kontraktion deutlich ab. Es konnte kein Unterschied der Abschwächung der Kontraktion im Vergleich zur Vorbehandlung der Gefäße mit Kaliumchlorid detektiert werden. Auch nach Gabe von 10⁻⁶ M DPO-1 in Anwesenheit der anderen Kanalblocker und von Natrium-Nitroprussid konnte keine Veränderung der Wandspannung detektiert werden. Damit konnte auch in diesem Kontext kein antikontraktiler Effekt für den Kv_{1.5}-Kanal in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid nachgewiesen werden.

Eine funktionelle Inaktivität des Kv_{1.5}-Kanals in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid wurde auch in einigen anderen Untersuchungen gefunden. Tsvetkov et al. konnten zeigen, dass Kv_{1.5}-Kanäle nicht an der Regulation des arteriellen Tonus mesenterialer Gefäße von Ratte sowie Maus beteiligt sind (Tsvetkov et al., 2016). Durch Choeng et al. wurde gar die vollständig fehlende Expression des Kv_{1.5}-Kanals bei gleichzeitiger Expression anderer Subtypen von Kv₁-Kanälen in den zerebralen Arteriolen der Maus aufgezeigt (Cheong et al., 2001b). Der ausbleibende antikontraktile Effekt des Kv_{1.5}-Kanals in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht durch andere Untersuchungen bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Versuchsreihe und den im letzten Absatz zitierten Studien, zeigen die meisten Untersuchungen des $Kv_{1.5}$ -Kanals auf, dass dieser Kaliumkanal an der Regulation des Membranpotentials und damit des vaskulären Tonus von Widerstandsgefäßen in einigen Gefäßbetten beteiligt ist. Zudem werde die Gefäßantwort auf intravasale Druckveränderungen, Vasokonstriktoren wie auch Vasodilatoren durch $Kv_{1.5}$ -Kanäle moduliert. Eine spezifische Blockade des $Kv_{1.5}$ -Kanals mittels DPO-1 induzierte eine Vasokonstriktion in vielen Gefäßbetten. Diese Nachweise gelangen in der mittleren Hirnarterie, verschiedenen Arterien des Skelettmuskels sowie den Mesenterialgefäßen der Ratte aber auch in der Aorta der Maus sowie in cerebralen Arteriolen von Kaninchen (Albarwani et al., 2003; Chen et al., 2006; Cheong et al., 2001a; Fancher et al., 2015; Kang et al., 2009; Lu et al., 2002; Overturf et al., 1994; Plane et al., 2005; Tykocki et al., 2017a).

Tykocki et al. zeigen in ihrem Review eine generelle Beteiligung spannungsabhängiger Kaliumkanäle an der durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelten Gefäßrelaxation auf. Gezeigt werden konnte diese an der Basilararterie, den Pulmonalarterien sowie der Aorta der Ratte (Sobey und Faraci, 1999; Tanaka et al., 2006; Tykocki et al., 2017a; Zhao et al., 1997). An den Koronarien des Hundes gelang der Nachweis der Beteiligung von Kv_1 -Kanälen an der SNP-induzierten Gefäßrelaxation (Dick et al., 2008). Fancher et al. konnten sogar dezidiert an den mittleren Hirnarterien sowie der Arteria gracilis der Ratte die Beteiligung von $Kv_{1.5}$ -Kanälen an der SNP-induzierten Gefäßrelaxation nachweisen. DPO-1 schwächte in den letztgenannten Gefäßbetten die Wirkung von Natrium-Nitroprussid (SNP) deutlich ab (Fancher et al., 2015).

In der hier vorgelegten Versuchsreihe gelang kein Nachweis einer Beteiligung des $Kv_{1.5}$ -Kanals am antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids (NO). Die Ursachen dieser unterschiedlichen Befunde bleiben bislang ungeklärt und beruhen möglicherweise auf Unterschieden in der gewählten Methodik.

Vergangene Studien untersuchten zwar im Allgemeinen die Interaktion zwischen Stickstoffmonoxid und spannungsabhängigen Kaliumkanälen, fokussierten sich hierbei jedoch oft nicht dezidiert auf die Subtypen der Kv_1 -Familie. Ferner liegen zu wenig Untersuchungen aus anderen Gefäßbetten bzw. Spezies vor, die die Interaktion zwischen Stickstoffmonoxid (vermittelt über den NO/sGC/PKG-Signalweg) und dem

Kv_{1.5}-Kanal abschließend klären könnten. Diesen beiden Problemfeldern sollten sich zukünftige Studien widmen.

4.2.4 Funktionelle Rolle des Kv₂-Kanals

Die funktionelle Blockade aller Kaliumkanäle unter Belassen des Kv_{2.1}-Kanals zeigte, wie bei der funktionellen Ausschaltung aller untersuchten Kaliumkanäle, eine deutliche Zunahme der Wandspannung. Diese war von der Wandspannung nach Vorbehandlung der Gefäßsegmente mit 50 mM Kaliumchlorid nicht zu unterscheiden. Im Rahmen der späteren Hinzugabe von 10⁻⁷ M Stromatoxin zur spezifischen Blockade des Kv_{2.1}-Kanals konnte keine weitere Zunahme der Blocker-induzierten Kontraktion detektiert werden. Das spricht dafür, dass dieser Kanal unter den gewählten Bedingungen funktionell nicht aktiv ist.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10⁻⁷ M schwächte die durch die Kanalblocker unter Ausschluss von Stromatoxin erzeugte Kontraktion deutlich ab. Es konnte kein Unterschied der Abschwächung der Kontraktion im Vergleich zur Vorbehandlung der Gefäße mit Kaliumchlorid detektiert werden. Auch nach Gabe von 10⁻⁷ M Stromatoxin in Anwesenheit der anderen Kanalblocker und von Natrium-Nitroprussid konnte keine Veränderung der Wandspannung detektiert werden. Damit konnte auch in diesem Kontext kein antikontraktiler Effekt für den Kv_{2.1}-Kanal in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid nachgewiesen werden.

Eine funktionelle Inaktivität des Kv_{2.1}-Kanals in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid wurde auch von Shvetsova et al. an der Arteria saphena der männlichen Ratte gefunden (Shvetsova et al., 2019). Amberg und Santana führen in ihrer Studie auf, dass frühere Untersuchungen spannungsabhängiger Kaliumkanäle eine dominante Rolle der Kv₁-Kanäle bei der Regulation des arteriellen Tonus betonen (Albarwani et al., 2003; Amberg und Santana, 2006; Cox et al., 2001; Plane et al., 2005). Neuere Untersuchungen ordnen diese Rolle insbesondere auch den Kv₇-Kanälen zu (Greenwood und Ohya, 2009a; Ng et al., 2011; Yeung et al., 2007).

Der ausbleibende antikontraktile Effekt des Kv_{2.1}-Kanals in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid kann gegenwärtig nicht durch andere Untersuchungen bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Versuchsreihe zeigen andere Untersuchungen des $Kv_{2.1}$ -Kanals auf, dass dieser Kaliumkanal neben dem $Kv_{1.5}$ -Kanal an der Regulation des Membranpotentials glatter Muskelzellen beteiligt ist und ein negatives Feedback gegenüber dem myogenen Tonus vermittelt. Amberg und Santana beobachteten hierbei eine funktionelle Gleichwertigkeit der $Kv_{1.5}$ - und $Kv_{2.1}$ -Kanäle.

Eine spezifische Blockade des $Kv_{2.1}$ -Kanals mittels Stromatoxin induzierte eine Vasokonstriktion in vielen Gefäßbetten. Dieser Nachweis gelang in den Zerebralarterien, den Mesenterialgefäßen, der Pulmonalarterie sowie der Aorta der Ratte sowie in den Mesenterialgefäßen der Maus. Zhong et al. konnten an der mittleren Hirnarterie der Ratte eine Beteiligung des $Kv_{2.1}$ -Kanals bei der Regulation bzw. Stabilisierung des Ruhemembranpotentials, vor allem bei negativem Membranpotential und niedrigem intravasalen Druck, aufzeigen (Amberg und Santana, 2006; Fountain et al., 2004; Lu et al., 2002; Moreno-Domínguez et al., 2009; Smirnov et al., 2002; Tamaro et al., 2004; Zhong et al., 2010a).

Tykocki et al. beschreiben in ihrem Review eine generelle Beteiligung spannungsabhängiger Kaliumkanäle an der durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelten Gefäßrelaxation. Gezeigt werden konnte diese an der Basilararterie, den Pulmonalarterien sowie der Aorta der Ratte (Sobey und Faraci, 1999; Tanaka et al., 2006; Tykocki et al., 2017a; Zhao et al., 1997). An den Gefäßmuskelzellen der Aorta der Ratte konnten Tanaka et al. die führende Rolle des $Kv_{2.1}$ -Kanals bei der durch Stickstoffmonoxid-Donatoren induzierten Gefäßrelaxation beobachten (Tanaka et al., 2006).

In der hier vorgelegten Versuchsreihe gelang kein Nachweis einer Beteiligung des $Kv_{2.1}$ -Kanals am antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids (NO). Die Ursachen dieser unterschiedlichen Befunde bleiben bislang ungeklärt und beruhen möglicherweise auf Unterschieden in der gewählten Methodik. Aber auch die Auswahl der untersuchten Gefäßregion könnte die Interaktion zwischen $Kv_{2.1}$ -Kanal und dem gefäßrelaxierenden NO/sGC/PKG-Signalweg modulieren. Vergangene Studien konnten zwar eine Beteiligung spannungsabhängiger Kaliumkanäle an der durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelten Gefäßrelaxation am Beispiel der Ratte feststellen, fokussierten sich hierbei jedoch meist auf Gefäße außerhalb der Skelettmuskulatur.

Diese Gefäßregion aber auch anderen Spezies sollten im Fokus zukünftiger Studien stehen.

4.2.5 Funktionelle Rolle des Kv₇-Kanals

Die funktionelle Blockade aller Kaliumkanäle unter Belassen des Kv₇-Kanals zeigte, wie bei der funktionellen Ausschaltung aller untersuchten Kaliumkanäle, eine Zunahme der Wandspannung. Diese war im Vergleich zur Wandspannung nach Vorbehandlung der Gefäßsegmente mit 50 mM Kaliumchlorid deutlich schwächer ausgeprägt. Im Rahmen der späteren Hinzugabe von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 zur spezifischen Blockade des Kv₇-Kanals konnte eine deutliche Zunahme der Blocker-induzierten Kontraktion detektiert werden. Das spricht dafür, dass dieser Kanal unter den gewählten Bedingungen funktionell aktiv ist und einen antikontraktilen Effekt vermittelt.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10^{-7} M schwächte die durch die Kanalblocker unter Ausschluss von XE991 erzeugte Kontraktion deutlich ab. Die Abschwächung der Kontraktion war im Vergleich zur Vorbehandlung der Gefäße mit Kaliumchlorid deutlich stärker ausgeprägt. Im Rahmen der späteren Hinzugabe von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 zur spezifischen Blockade des Kv₇-Kanals in Anwesenheit der anderen Kanalblocker und von Natrium-Nitroprussid konnte erneut eine deutliche Zunahme der Kontraktion detektiert werden. Hierbei war die XE991-induzierte Zunahme der Kontraktion in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid größer als in dessen Abwesenheit. Sowohl in Anwesenheit als auch Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid konnte – in Anwesenheit größerer – ein antikontraktiler Effekt für den Kv₇-Kanal nachgewiesen werden, was auf eine Aktivierung des Kv₇-Kanals durch Natrium-Nitroprussid unter diesen Versuchsbedingungen hinweist.

Die funktionelle Blockade des Kv₇-Kanals unter Belassen der übrigen untersuchten Kaliumkanäle zeigte eine deutliche Zunahme der Methoxamin-induzierten Wandspannung in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid (SNP). Diese Beobachtung bestätigt den zuvor gefundenen antikontraktilen Effekt des Kv₇-Kanals. Die Gabe von Natrium-Nitroprussid (SNP) mit einer Konzentration von 10^{-8} M schwächte die Methoxamin-induzierte Wandspannung nur in Anwesenheit von XE991 ab. Bei Abwesenheit des spezifischen Kv₇-Kanalblockers war noch keine Veränderung der

Wandspannung zu detektieren – XE991 führte somit zum Erscheinen einer Wirkung von Natrium-Nitroprussid.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid mit einer gesteigerten Konzentration von 10^{-7} M schwächte indessen die Methoxamin-induzierte Wandspannung in Anwesenheit als auch Abwesenheit von XE991 deutlich ab. XE991 verstärkte den antikontraktilen Effekt von Natrium-Nitroprussid (SNP).

In Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (SNP) konnte nach Hinzugabe von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 keine Veränderung der Wandspannung detektiert werden. Damit hob Natrium-Nitroprussid die Wirkung des spezifischen Kv_7 -Kanalblockers vollständig auf, was auf eine Deaktivierung des Kv_7 -Kanals unter diesen Versuchsbedingungen hinweist. Dies verdeutlicht, dass der Kv_7 -Kanal in dem Sinne an der SNP-induzierten Gefäßrelaxation beteiligt ist, dass er den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) limitieren kann.

Die zuvor beschriebenen Versuchsreihen verdeutlichen, dass Stickstoffmonoxid (NO) einen konzentrationsabhängigen antikontraktilen Effekt aufweist. Sie zeigen zugleich auf, dass der Kv_7 -Kanal in dem Sinne an der SNP-induzierten Gefäßrelaxation beteiligt ist, dass er den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO), in Abhängigkeit von den Kontraktionsbedingungen bzw. dem erreichten Kontraktionsniveau der untersuchten Gefäße, fördern wie auch limitieren kann.

Erfolgte die funktionelle Blockade alle untersuchten Kaliumkanäle unter initialem Belassen des Kv_7 -Kanals und wurde hierdurch ein hohes Kontraktionsniveau induziert, so aktivierte die anschließende Gabe von Natrium-Nitroprussid (SNP) den Kv_7 -Kanal. Dies förderte den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxid (NO). Wurden hingegen die übrigen untersuchten Kaliumkanäle funktionell aktiv belassen und nur der Kv_7 -Kanal blockiert, so wurde nur ein niedrigeres Kontraktionsniveau erreicht, und eine, in diesem Falle Vorinkubation mit Natrium-Nitroprussid (SNP) deaktivierte den Kv_7 -Kanal und limitierte schließlich den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO). Die diesen unterschiedlichen Rollen des Kv_7 -Kanals zugrundeliegenden Mechanismen wurden weder in der vorliegenden noch in anderen Studie bisher näher untersucht und bleiben zum aktuellen Zeitpunkt ungeklärt.

Um die Möglichkeit eines Zusammenspiels der Kaliumkanalfamilien bei der Beteiligung von Kaliumkanälen am antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO)

zu untersuchen, erfolgte die kombinierte funktionelle Blockade des Kv_7 -Kanals sowie des BK_{Ca} -Kanals unter Belassen der übrigen untersuchten Kaliumkanäle.

Im Rahmen dieser kombinierten Kanalblockade zeigte sich eine deutliche Zunahme der Methoxamin-induzierten Wandspannung in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid (SNP). Die Gabe von Natrium-Nitroprussid schwächte die Methoxamin-induzierte Wandspannung in Abwesenheit als auch Anwesenheit von XE991 sowie Iberitoxin ab. Die Kombination von XE991 und Iberitoxin verstärkte den antikontraktile Effekt von Natrium-Nitroprussid (SNP). In Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (SNP) mit einer Konzentration von 10^{-8} M konnte nach Hinzugabe von $3 \cdot 10^{-6}$ M XE991 sowie von 10^{-7} M Iberitoxin eine Zunahme der Methoxamin-induzierten Wandspannung festgestellt werden. Dabei konnte kein Effekt von Natrium-Nitroprussid auf die Wirkung der spezifischen Kv_7 - sowie BK_{Ca} -Kanalblocker detektiert werden. Auch in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid (SNP) mit einer gesteigerten Konzentration von 10^{-7} M konnte eine Zunahme der Methoxamin-induzierten Wandspannung festgestellt werden. Allerdings schwächte Natrium-Nitroprussid unter den gewählten Bedingungen den kontraktile Effekt der beiden Kaliumkanalblocker ab. Die Ergründung des genauen Mechanismus der Interaktion beider Kaliumkanäle in der SNP-induzierten Gefäßrelaxation erfordert weitere, über die vorgelegte Arbeit hinausgehende Untersuchungen.

Eine funktionelle Aktivität des Kv_7 -Kanals in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid wurde auch in anderen Untersuchungen gefunden. Diese zeigen auf, dass Kv_7 -Kanäle in ihrer Gesamtheit zum Erhalt des Ruhemembranpotential beitragen und gleichzeitig durch ihre Aktivität sowohl den myogenen wie auch den durch unterschiedliche Vasokonstriktoren induzierten Gefäßtonus im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus limitieren. Dieser Nachweis gelang in der Aorta, Portalvene, Arteria carotis, Arteria femoralis sowie den Mesenterialgefäßen der Maus aber auch in den Mesenterialgefäßen, Zerebralarterien, Koronarien, der Aorta und Arteria saphena der Ratte sowie am menschlichen Modell (Brueggemann et al., 2007; Greenwood und Ohya, 2009a; Jepps et al., 2013; Khanamiri et al., 2013; Mackie et al., 2008; Mackie und Byron, 2008; Ohya et al., 2003; Shvetsova et al., 2019; Stott et al., 2014; Tykocki et al., 2017a; Yeung et al., 2007; Zhong et al., 2010b). Greenwood und Ohya führen in ihrer Studie auf, dass einige Studien zeigen konnten, dass überwiegend $Kv_{7.1}$ -, $Kv_{7.4}$ - sowie $Kv_{7.5}$ -Kanäle in der glatter Gefäßmuskulatur exprimiert und unterdessen

Kv_{7.1}-Kanäle eine eher redundante Rolle einzunehmen scheinen (Brueggemann et al., 2014; Chadha et al., 2014; Greenwood und Ohya, 2009b; Stott und Greenwood, 2015). Die spezifische Blockade der Kv₇-Kanäle mittels XE991 induzierte eine Vasokonstriktion in den meisten Gefäßen (Jensen et al., 2005; Mackie et al., 2008; Yeung und Greenwood, 2005; Yeung et al., 2007).

Der antikontraktile Effekt des Kv₇-Kanals in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid wurde ebenfalls in anderen Untersuchungen gefunden. Diese beschreiben eine Relaxation der Nierenarterie sowie der Aorta der Ratte induziert durch Natrium-Nitroprussid und vermittelt über den NO/sGC/PKG-Signalweg. Eine spezifische Blockade der Kv₇-Kanäle schwächte die induzierte Relaxation ab (Stott et al., 2015; Stott und Greenwood, 2015).

Während die meisten anderen Untersuchungen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bestätigen, konnten an den Mesenterialgefäßen der Ratte variable Effekte für den pan-Kv₇-Kanalblocker XE991 beobachtet werden. Neben vollständig ausbleibender Konstriktion konnte auch eine Relaxation der Mesenterialgefäßen in Abwesenheit vasodilatierender Stimuli festgestellt werden (Joshi et al., 2006; Mackie et al., 2008; Yeung et al., 2007). Ein ausbleibender antikontraktiler Effekt für den Kv₇-Kanal in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid wurde an den Koronarien des Schweins und an den Nierenarterien der Ratte detektiert (Hedegaard et al., 2014; Khanamiri et al., 2013; Stott und Greenwood, 2015; Tykocki et al., 2017a).

In der hier vorgelegten Versuchsreihe gelang der Nachweis einer Beteiligung des Kv₇-Kanals am antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO). Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Kv₇-Kanal in Abhängigkeit vom Kontraktionsniveau der untersuchten Gefäße und der Art der Zugabe des NO-Donators den antikontraktilen Effekt sowohl fördern (bei höherem Kontraktionsniveau und akuter Gabe) als auch limitieren (bei niedrigerem Kontraktionsniveau und Vorinkubation) kann. Die Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen stand nicht im Fokus dieser Studie und bleibt aktuell ungeklärt.

Die Ergebnisse der vorgelegten Studie stehen im Konsens mit den Ergebnissen vieler Untersuchungen. Abweichende Ergebnisse anderer Studien, die keine Interaktion zwischen dem Kv₇-Kanal und dem NO/sGC/PKG-Signalweg nachweisen konnten, deuten drauf hin, dass es sowohl spezie- als auch gefäßspezifische Unterschiede zu

geben scheint. Ferner erfolgte in dieser sowie den meisten anderen Untersuchungen, durch die Verwendung des pan-Kv₇-Kanalblockers XE991, keine dezidierte Betrachtung der Subtypen der Kv₇-Familie. Daher bleibt unklar, welche Kanäle der Kv₇-Familie vorrangig für die beobachteten Ergebnisse verantwortlich sind. Die Untersuchung anderer Spezies sowie Gefäßregionen aber auch die dezidierte Untersuchung der Subtypen der Kv₇-Familie sollte im Fokus zukünftiger Studien stehen.

4.2.6 Funktionelle Rolle des BK_{Ca}-Kanals

Die funktionelle Blockade aller Kaliumkanäle unter Belassen des BK_{Ca}-Kanals zeigte, wie bei der funktionellen Ausschaltung aller untersuchten Kaliumkanäle, eine Zunahme der Wandspannung. Diese war im Vergleich zur Wandspannung nach Vorbehandlung der Gefäßsegmente mit 50 mM Kaliumchlorid deutlich schwächer ausgeprägt. Im Rahmen der späteren Hinzugabe von 10⁻⁷ M Iberiotoxin zur spezifischen Blockade des BK_{Ca}-Kanals konnte eine deutliche Zunahme der Blocker-induzierten Kontraktion detektiert werden. Das spricht dafür, dass dieser Kanal unter den gewählten Bedingungen funktionell aktiv ist und einen antikontraktilen Effekt vermittelt.

Die Gabe von Natrium-Nitroprussid in einer Konzentration von 10⁻⁷ M schwächte die durch die Kanalblocker unter Ausschluss von Iberiotoxin erzeugte Kontraktion deutlich ab. Es konnte kein Unterschied der Abschwächung der Kontraktion im Vergleich zur Vorbehandlung der Gefäße mit Kaliumchlorid detektiert werden. Im Rahmen der späteren Hinzugabe von 10⁻⁷ M Iberiotoxin zur spezifischen Blockade des BK_{Ca}-Kanals in Anwesenheit der anderen Kanalblocker und von Natrium-Nitroprussid konnte erneut eine deutliche Zunahme der Kontraktion detektiert werden. Hierbei konnte kein Unterschied der Iberiotoxin-induzierten Zunahme der Kontraktion in Abwesenheit und Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid detektiert werden. Sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid konnte ein, nicht unterscheidbarer, antikontraktiler Effekt für den BK_{Ca}-Kanal nachgewiesen werden.

Die funktionelle Blockade des BK_{Ca}-Kanals unter Belassen der übrigen untersuchten Kaliumkanäle zeigte eine deutliche Zunahme der Methoxamin-induzierten Wandspannung in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid. Diese Beobachtung bestätigt den zuvor gefundenen antikontraktilen Effekt des BK_{Ca}-Kanals. Die Gabe von Natrium-

Nitroprussid schwächte die Methoxamin-induzierte Wandspannung in Abwesenheit als auch Anwesenheit von Iberiotoxin deutlich ab. Auch in Anwesenheit von Natrium-Nitroprussid verstärkte die spätere Hinzugabe von 10^{-7} M Iberiotoxin zur spezifischen Blockade des BK_{Ca}-Kanals die Methoxamin-induzierte Wandspannung. Hierbei konnte beobachtet werden, dass Iberiotoxin den antikontraktilen Effekt von Natrium-Nitroprussid verstärken kann bzw. Natrium-Nitroprussid den kontraktilen Effekt von Iberiotoxin abschwächt, das heißt den antikontraktilen Effekt des BK_{Ca}-Kanals verringert, was auf eine Deaktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch Natrium-Nitroprussid hinweist.

Dies verdeutlicht, dass der BK_{Ca}-Kanal in dem Sinne an der SNP-induzierten Gefäßrelaxation beteiligt ist, dass er den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) limitiert.

Eine funktionelle Aktivität des BK_{Ca}-Kanals in Abwesenheit von Natrium-Nitroprussid wurde auch in anderen Untersuchungen gefunden. Diese zeigen auf, dass BK_{Ca}-Kanäle in zahlreichen Gefäßen bereits unter Ruhebedingungen aktiv sind, zum Ruhemembranpotential beitragen sowie ein negatives Feedback gegenüber dem myogenen Tonus vermitteln. Eine spezifische Blockade des BK_{Ca}-Kanals mittels Iberiotoxin induzierte eine Vasokonstriktion in vielen Gefäßbetten. Dieser Nachweis gelang beispielsweise in den Cerebralarterien sowie Koronarien von Kaninchen, der Schwanzarterie, Arteria saphena, den Nierenarterien, Mesenterialgefäßen sowie den Arterien und Arteriolen des Musculus cremaster der Ratte, den Arterien und Arteriolen des Musculus cremaster des Hamsters, den Arterien des Musculus cremaster, der Schwanzarterie und epigastrischen Arterien der Maus sowie an subepikardialen Arterien des Hundes (Berczi et al., 1992; Brayden und Nelson, 1992; Cabell et al., 1994; Hayoz et al., 2014; Howitt et al., 2011; Jackson-Weaver et al., 2011; Kokita et al., 1999; Kotecha und Hill, 2005; Lucchesi et al., 2005; Nelson et al., 1995; Prior et al., 1998b; Rogers et al., 2007a; Schmid et al., 2018; Schubert et al., 1997; Tykocki et al., 2017a; Westcott et al., 2012; Westcott und Jackson, 2011; Yashiro und Duling, 2003). An den Koronarien von Schweinen beeinflusste Iberiotoxin zwar nicht direkt das Ruhemembranpotential, verstärkte jedoch die Druck-induzierte Depolarisation glatter Gefäßmuskelzellen, wodurch folglich auch an diesen Gefäßen eine Beteiligung des BK_{Ca}-Kanals am negativen Feedback gegenüber dem myogenen Tonus detektiert werden konnte (Wu und Davis, 2001).

Der antikontraktile Effekt des BK_{Ca}-Kanals in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid wurde ebenfalls in anderen Untersuchungen gefunden. Tykocki et al. führen in ihrem Review zahlreiche Gefäße auf, in denen eine Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals durch Stickstoffmonoxid (NO) eine Gefäßrelaxation induzierte. Dieser Nachweis gelang beispielsweise an den Mesenterialarterien von Kaninchen, den Penisarterien des Pferdes, den Koronarien, Mesenterial- und Cerebralarterien, der Schwanzarterien sowie der Arteria saphena der Ratte, den Cerebralarterien des Hundes und an den Koronarien des Menschen. Eine spezifische Blockade des BK_{Ca}-Kanals schwächte in diesen Gefäßen die NO-induzierte Gefäßrelaxation ab (Bychkov et al., 1998; Khan et al., 1993; Onoue und Katusic, 1997; Paternò et al., 1996; Plane et al., 1996; Price und Hellermann, 1997; Schmid et al., 2018; Simonsen et al., 1995; Sun et al., 2000; Tykocki et al., 2017a; Wellman et al., 1996). Ältere Studien formulierten, dass der BK_{Ca}-Kanal möglicherweise durch Stickstoffmonoxid (NO) direkt aktiviert wird (Bolotina et al., 1994; Mistry und Garland, 1998; Plane et al., 1996).

Die meisten Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals nicht direkt über Stickstoffmonoxid (NO), sondern hauptsächlich über den NO/cGMP/PKG- Signalweg vermittelt wird (Archer et al., 1994; Gagov et al., 2022; Gribkova et al., 2002; Robertson et al., 1993; Schmid et al., 2018; Tykocki et al., 2017a). So zeigten zum Beispiel Schmid et al. in ihrer Studie, dass NO-Fänger wie Hydroxycobalamin oder die Hemmung der löslichen Guanylatzyklase mittels ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) den antikontraktilen Effekt von Natrium-Nitroprussid vollständig beseitigen konnten. Durch die Hemmung der cGMP-sensitiven Proteinkinase mittels Rp-8-Br-PET-cGMPS konnte der antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) zumindest teilweise aufgehoben werden, wobei diese Substanz nur in einer submaximalen Konzentration eingesetzt werden konnte, um keine unspezifischen Nebenwirkungen zu erzeugen (Schmid et al., 2018). Diese Beobachtungen werden durch Gagov et al. unterstützt (Gagov et al., 2022).

Die limitierende Wirkung des BK_{Ca}-Kanals auf den antikontraktilen Effekt von Stickstoffmonoxid (NO) wurde ebenso von Schmid et al. gefunden. Diese konnten an der Schwanzarterie von Maus und Ratte sowie an der Arteria saphena der Ratte zeigen, dass endogenes oder durch verschiedene NO-Donatoren (Bsp. Natrium-Nitroprussid) freigesetztes Stickstoffmonoxid (NO) einerseits einen konzentrations-

abhängigen antikontraktilen Effekt aufweist und andererseits eine funktionelle Blockade des BK_{Ca}-Kanals durch den spezifischen BK_{Ca}-Kanalblocker Iberiotoxin diesen antikontraktilen Effekt, im Vergleich zu Versuchen in deren Rahmen keine funktionelle Blockade des Kanals erfolgte, verstärkt. Schmid et al. konnten dies vor allem bei niedrigeren Kontraktionsniveaus der untersuchten Gefäße beobachten und formulierten hierzu nachfolgende mechanistische Überlegungen:

Bei höheren Kontraktionsniveaus induziert Stickstoffmonoxid (NO) – vermittelt über die Proteinkinase G (PKG) – eine Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals. Diese Aktivierung ist hierbei stärker ausgeprägt als eine durch den geringen Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration – bedingt durch den Schluss spannungsabhängiger Calciumkanäle vom L-Typ (VOC) – entgegenwirkende Deaktivierung des BK_{Ca}-Kanals, sodass summativ die Aktivität des BK_{Ca}-Kanals gesteigert und damit eine NO-induzierte Gefäßrelaxation begünstigt wird. Bei niedrigem Kontraktionsniveau kehren sich die Verhältnisse jedoch um. Durch die starke Abnahme der Calciumkonzentration überwiegt jetzt die Deaktivierung die NO-induzierte und durch die Proteinkinase G vermittelte Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals, sodass in Summe die Aktivität des BK_{Ca}-Kanals abnimmt und in dessen Folge die NO-induzierte Gefäßrelaxation begrenzt wird (Schmid et al., 2018).

Während die meisten anderen Untersuchungen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bestätigen, besteht gleichzeitig auch Evidenz, die gegen eine Beteiligung des BK_{Ca}-Kanals an der Regulation des Ruhemembranpotentials und des negativen Feedbacks gegenüber dem myogenen Tonus spricht. Iberiotoxin zeigte keinen Effekt an den Basilararterien der Ratte auf und beeinflusste nicht das Ruhemembranpotential von Schweinekoronararterien (Faraci und Sobey, 1998; Paternò et al., 1997; Wu und Davis, 2001). Im Bereich der Arteria gracilis der Ratte besteht Evidenz gegen (in vivo) aber auch für (in vitro) einen antikontraktilen Effekt von Iberiotoxin (Samora et al., 2007; Ungvari und Koller, 2001). Vor allem in den Arteriolen verschiedener Gefäßbetten wurde durch zahlreiche Studien eine fehlende Beteiligung des BK_{Ca}-Kanals an der Regulation von Membranpotential und Gefäßtonus gefunden. Gezeigt werden konnte dies an den Arteriolen des Musculus cremaster von Ratte (in vivo) und Hamster (in vivo), an zerebralen Arteriolen von Ratte, Katze und neugeborenen Schweinen, an retinalen Arteriolen von Ratte und Schwein sowie an Arteriolen der Niere der Ratte (Armstead, 1997a, b; Cipolla et al., 2014; Dabertrand et al., 2012; Hong et al., 1996;

Jackson, 1998; Jackson et al., 1997; Magnusson et al., 2007; Mayhan und Faraci, 1993; Mori et al., 2011; Nagaoka et al., 2007; Tanano et al., 2013; Tykocki et al., 2017a; Wei et al., 1996; Yashiro und Duling, 2003). An den Arteriolen des Musculus soleus der Ratte zeigte Iberiotoxin einen altersabhängigen Effekt und steigerte den myogenen Tonus nur bei alten (24 Monate alt) jedoch nicht bei jungen (4 Monate alt) Versuchstieren (Kang et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich aus den zuvor genannten Untersuchungen ableiten, dass vor allem im Bereich der Arteriolen sowie kleiner Arterien der BK_{Ca}-Kanal keine funktionelle Rolle bei der Regulation des Ruhemembranpotentials und des negativen Feedbacks gegenüber dem myogenen Tonus einzunehmen scheint, wohingegen diese Rolle durch zahlreiche Studien vor allem in größeren Arterien bzw. Leitgefäßen nachgewiesen werden konnte.

Ein ausbleibender antikontraktiler Effekt für den BK_{Ca}-Kanal in Zusammenhang mit Natrium-Nitroprussid wurde ebenso in anderen Untersuchungen gefunden. Tykocki et al. führen in ihrem Review zahlreiche Studien auf, die bei spezifischer Blockade des BK_{Ca}-Kanals keinen Effekt auf die NO-induzierte Gefäßrelaxation detektieren konnten. Gezeigt werden konnte dies beispielsweise an den Cerebralarterien von jungen Schweinen, den Ziliar- und Koronararterien von Schweinen, den Mesenterialarterien der Ratte, den Iliacalarterien, der Aorta sowie der Arteria carotis von Kaninchen (Armstead, 1997b; Cooke et al., 1991; Dong et al., 1997; Ghisdal et al., 2000; Hansen und Olesen, 1997; Hernanz et al., 1999; Kilpatrick und Cocks, 1994; Plane et al., 1998; Zhu et al., 1997). Die Ursachen dieser Beobachtungen, die im Dissens zu den Beobachtungen zuvor zitierter Untersuchungen stehen, bleiben bislang ungeklärt. Möglich erscheint, dass sowohl spezieis- aber auch gefäßspezifische Eigenschaften die Rolle des BK_{Ca}-Kanals bei der NO-induzierten Gefäßrelaxation beeinflussen könnten.

In den hier vorliegenden Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass der BK_{Ca}-Kanal einen antikontraktilen Effekt aufweist und an der NO-induzierten Gefäßrelaxation beteiligt ist, wobei er den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) limitierte. Die Untersuchung der zugrundeliegende Mechanismen stand nicht im Fokus dieser Studie, wurde jedoch in einem anderen Projekt unserer Arbeitsgruppe aufgegriffen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit vom Kontraktionsstatus der

untersuchten Gefäße der BK_{Ca}-Kanal die NO-induzierte Gefäßrelaxation fördern (bei höherem Kontraktionsniveau) aber auch limitieren (bei niedrigerem Kontraktionsniveau) kann. Bei einem niedrigen Kontraktionsniveau induziert Stickstoffmonoxid (NO), vermittelt über die Proteinkinase G (PKG) eine Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals, die schwächer ausgeprägt ist als die zeitgleiche Deaktivierung des Kaliumkanals, die durch den NO-induzierten Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration bedingt wird. In der Summe wird so der antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) limitiert. Bei hohem Kontraktionsniveau kehren sich diese Verhältnisse um und der antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) wird durch eine summierte Aktivierung des BK_{Ca}-Kanals begünstigt. Seine Wirkung vermittelt Stickstoffmonoxid (NO) hierbei hauptsächlich über den NO/cGMP/PKG- Signalweg (Schmid et al., 2018).

Die Ergebnisse der vorgelegten Studie stehen im Konsens aber auch im Dissens mit den Ergebnissen vieler Untersuchungen. Abweichende Ergebnisse anderer Studien, die meist nur einen antikontraktilen aber nicht limitierenden Effekt des BK_{Ca}-Kanals oder gar keine Interaktion zwischen dem BK_{Ca}-Kanal und dem NO/sGC/PKG-Signalweg nachweisen konnten, deuten darauf hin, dass es sowohl spezies- als auch gefäßspezifische Unterschiede in der Rolle des BK_{Ca}-Kanals bei der NO-vermittelten Gefäßrelaxation zu geben scheint. Daneben scheint auch das Alter der Versuchstiere, die Wahl der Methodik sowie der Untersuchungsbedingungen (in vitro vs. in vivo), das Kontraktionsniveau und die Größe der untersuchten Gefäße einen Einfluss auf die Ergebnisse auszuüben. Der weiteren Aufklärung dieser verschiedenen Einflussfaktoren sollten sich zukünftige Studien widmen.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In den vorliegenden Versuchsreihen konnte am Modell der Arteria saphena der Ratte für den einwärts-gleichrichtenden (Kir₂) sowie für den ATP-sensitiven (Kir₆) Kaliumkanal keine Beteiligung am antikontraktilen Effekt von Natrium-Nitroprussid (SNP) aufgezeigt werden. Auch für den Kv_{1.5}- und Kv_{2.1}-Subtyp der großen Familie spannungsabhängiger Kaliumkanäle konnte kein Nachweis einer Beteiligung erbracht werden. Eine weitere Untersuchung unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass auch Zweiporen-Domänen Kaliumkanäle (TASK-1) nicht am antikontraktilen Effekt von Natrium-Nitroprussid (SNP) beteiligt sind.

Für den Kv₇-Subtyp der spannungsabhängigen Kaliumkanäle sowie für den Calcium-aktivierten Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}) konnte in der vorgelegten Studie hingegen gezeigt werden, dass diese beiden Kaliumkanäle am antikontraktilen Effekt von Natrium-Nitroprussid (SNP) beteiligt sind.

In diesem Kontext wurde angenommen, dass Stickstoffmonoxid (NO), nicht enzymatisch freigesetzt aus Natrium-Nitroprussid (SNP), seine antikontraktile Wirkung hauptsächlich über den NO/sGC/PKG-Signalweg vermittelt. So zeigen ähnliche Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass durch NO-Fänger oder durch die Hemmung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) sowie der cGMP-sensitiven Proteinkinase G (PKG) der antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) aufgehoben werden konnte. (Gagov et al., 2022; Schmid et al., 2018; Schubert et al., 2004).

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass der Kv₇-Kanal den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) in Abhängigkeit vom Kontraktionsniveau der untersuchten Gefäßsegmente und der Art der Zugabe des NO-Donators beeinflusste. Bei einem höheren Kontraktionsniveau und akuter Gabe wurde der antikontraktile Effekt gefördert während bei einem niedrigeren Kontraktionsniveau und Vorinkubation Gegenteiliges zu beobachten war – unter diesen Bedingungen limitierte der Kv₇-Kanal den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO). Die diesen unterschiedlichen Rollen des Kv₇-Kanals zugrundeliegende Mechanismen bleiben bislang ungeklärt und sollten im Fokus zukünftiger Untersuchungen stehen.

Für den BK_{Ca}-Kanal konnte in der vorliegenden Untersuchung nur eine limitierende Wirkung auf den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) gefunden werden, während in einem weiteren Projekt unserer Arbeitsgruppe neben einer limitierenden auch eine fördernde Wirkung auf den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) aufgezeigt werden konnte. Hierzu zeigen Schmid et al. auf, dass – wie auch beim Kv₇-Kanal in dieser Studie beobachtet – bei einem niedrigeren Kontraktionsniveau der untersuchten Gefäße der antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) durch den BK_{Ca}-Kanal limitiert wurde, während bei einem höheren Kontraktionsniveau vielmehr eine fördernde Wirkung für den BK_{Ca}-Kanal gefunden werden konnte. Zugrunde liege diesen Beobachtungen zeitgleich ablaufende den BK_{Ca}-Kanal über die Proteinkinase G (PKG) direkt aktivierende wie auch über die PKG-vermittelte

Hemmung von spannungsabhängigen Calciumkanälen deaktivierende Signalwege, die allesamt durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt werden (Schmid et al., 2018).

Fasst man die Ergebnisse der vorliegenden Studie zusammen, ergibt sich daraus, dass an der Arteria saphena der Ratte gezeigt werden konnte, dass der antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids (NO) – freigesetzt aus dem NO-Donator Natrium-Nitroprussid (SNP) – gleichzeitig durch den K_{V7} - sowie BK_{Ca} -Kanal vermittelt wird. Offen bleibt die Frage, ob diese Ergebnisse auch auf andere Gefäße, Spezies oder gar den Menschen übertragen werden können.

Natrium-Nitroprussid (SNP) wird als hochpotenter Vasodilatator vor allem im Bereich der Anästhesie sowie Intensivmedizin zur Therapie der arteriellen Hypertonie eingesetzt (Larsen, 2012). Die arterielle Hypertonie ist die häufigste internistische Erkrankung und gilt als bedeutendster Risikofaktor bezüglich Lebensqualität und Lebenserwartung (Herold, 2023). Tykocki et al. zeigen in ihrem Review zahlreiche Studien auf, die bereits beobachten konnten, dass kardiovaskuläre Erkrankungen, wie unter anderem das Krankheitsbild der arteriellen Hypertonie, die Expression sowie die Funktion von Kaliumkanälen glatter Gefäßmuskelzellen beeinflussen können (Tykocki et al., 2017a).

Die vorliegenden Ergebnisse bilden eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen der Beteiligung von Kaliumkanälen an der durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelten Gefäßrelaxation unter pathophysiologischen Bedingungen, die mit einer veränderten Aktivität von Kaliumkanälen einhergehen könnten, um hieraus gegebenenfalls neue therapeutische Konzepte entwickeln zu können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Eine bedarfsgerechte Blutversorgung der verschiedenen Organe und Gewebe des Organismus wird durch eine an den Bedarf adaptierte Veränderung des arteriellen Gefäßtonus sichergestellt. Das Membranpotential glatter Gefäßmuskelzellen stellt einen der wichtigsten Regulatoren des arteriellen Gefäßtonus dar und wird hauptsächlich von kaliumselektiven Ionenkanälen reguliert.

In glatter Gefäßmuskulatur sind verschiedene Kaliumkanäle funktionell in Erscheinung getreten. Man unterscheidet spannungsabhängige (Kv) sowie Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK_{Ca}), ATP-sensitive (K_{ATP} bzw. K_{ir6}), einwärts-gleichrichtende (K_{ir2}) sowie Zweiporen-Domänen (K_2P) Kaliumkanäle.

Eine Aktivierung dieser kaliumselektiven Ionenkanäle induziert eine Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen mit konsekutiver Deaktivierung spannungsabhängiger Calciumkanäle vom L-Typ, Abfall der intrazellulären Calciumkonzentration und Förderung einer Gefäßrelaxation.

Natrium-Nitroprussid ist ein hochpotenter endothelunabhängiger Vasodilatator, der beispielsweise zur Therapie der arteriellen Hypertonie eingesetzt wird und dessen gefäßrelaxierende Wirkung auf der nicht-enzymatischen Freisetzung von Stickstoffmonoxid in glatte Gefäßmuskelzellen beruht.

Mittels Multiwire Myographie wurde an der isolierten Arteria saphena der männlichen Wistar Ratte systematisch die Beteiligung aller in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesenen Kaliumkanäle an der durch Natrium-Nitroprussid induzierten Gefäßrelaxation untersucht. Auf diese Weise wurde die Hypothese untersucht, dass der antikontraktile Effekt des Stickstoffmonoxids gleichzeitig durch mehrere Kaliumkanäle vermittelt wird.

In der vorliegenden Untersuchung konnte für den einwärts-gleichrichtenden (K_{ir2}) sowie für den ATP-sensitiven (K_{ATP} bzw. K_{ir6}) Kanal keine Beteiligung am antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids aufgezeigt werden. Auch für den $Kv_{1.5}$ - und $Kv_{2.1}$ -Subtyp der spannungsabhängigen Kaliumkanäle konnte kein Nachweis erbracht werden.

Eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass auch TASK-1 (K₂P) Kanäle nicht an der durch Stickstoffmonoxid induzierten Gefäßrelaxation beteiligt sind.

Der Kv₇-Kanal beeinflusste den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids in Abhängigkeit vom Kontraktionsniveau der untersuchten Gefäße und der Art der Zugabe des Stickstoffmonoxid-Donators. Bei einem höheren Kontraktionsniveau und akuter Gabe zeigte sich hierbei eine den antikontraktilen Effekt fördernde Wirkung, während hingegen bei einem niedrigeren Kontraktionsniveau und Vorinkubation eine limitierende Wirkung gefunden werden konnte.

Für den BK_{Ca}-Kanal zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie nur eine limitierende Wirkung auf den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids. Ergänzend hierzu konnte jedoch in einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass auch der BK_{Ca}-Kanal – in einer ähnlichen Abhängigkeit vom Kontraktionsniveau der untersuchten Gefäße wie für den Kv₇-Kanal in dieser Studie gezeigt – sowohl eine fördernde als auch limitierende Wirkung auf den antikontraktilen Effekt des Stickstoffmonoxids vermittelt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abbink, E.J., Wollersheim, H., Netten, P.M., Russel, F.G., Lutterman, J.A. und Smits, P. (2002). Microcirculatory effects of KATP channel blockade by sulphonylurea derivatives in humans. *Eur J Clin Invest* 32, 163-171. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2002.00964.x>

Alagem, N., Dvir, M. und Reuveny, E. (2001). Mechanism of Ba²⁺ block of a mouse inwardly rectifying K⁺ channel: differential contribution by two discrete residues. *The Journal of Physiology* 534, 381-393. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00381.x>

Albarwani, S., Nemetz, L.T., Madden, J.A., Tobin, A.A., England, S.K., Pratt, P.F. und Rusch, N.J. (2003). Voltage-gated K⁺ channels in rat small cerebral arteries: molecular identity of the functional channels. *J Physiol* 551, 751-763. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.040014>

Amberg, G.C. und Santana, L.F. (2006). Kv2 channels oppose myogenic constriction of rat cerebral arteries. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C348-356. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00086.2006>

Andriantsitohaina, R., Lagaud, G.J., Andre, A., Muller, B. und Stoclet, J.C. (1995). Effects of cGMP on calcium handling in ATP-stimulated rat resistance arteries. *Am J Physiol* 268, H1223-1231. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.268.3.H1223>

Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J. und Weir, E.K. (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7583-7587. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7583>

Armstead, W.M. (1997a). Role of activation of calcium-sensitive K⁺ channels and cAMP in opioid-induced pial artery dilation. *Brain Res* 747, 252-258. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(96\)01284-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(96)01284-x)

Armstead, W.M. (1997b). Role of activation of calcium-sensitive K⁺ channels in NO- and hypoxia-induced pial artery vasodilation. *Am J Physiol* 272, H1785-1790. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.4.H1785>

Banitt, P.F., Smits, P., Williams, S.B., Ganz, P. und Creager, M.A. (1996). Activation of ATP-sensitive potassium channels contributes to reactive hyperemia in humans. *Am J Physiol* 271, H1594-1598. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.4.H1594>

Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra, R., Jr. und Harrison, D.G. (1991). Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochemical pharmacology* 42 *Suppl*, S157-165. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90406-u](https://doi.org/10.1016/0006-2952(91)90406-u)

Berczi, V., Stekiel, W.J., Contney, S.J. und Rusch, N.J. (1992). Pressure-induced activation of membrane K⁺ current in rat saphenous artery. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 19, 725-729. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.19.6.725>

- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Pagano, P.J. und Cohen, R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850-853. <https://doi.org/10.1038/368850a0>
- Bonaventura, D., de Lima, R.G., Vercesi, J.A., da Silva, R.S. und Bendhack, L.M. (2007). Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. *Vascul Pharmacol* 46, 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.10.002>
- Bonev, A.D. und Nelson, M.T. (1996). Vasoconstrictors inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle through protein kinase C. *J Gen Physiol* 108, 315-323. <https://doi.org/10.1085/jgp.108.4.315>
- Borysenko, M. und Beringer, T. (1984). *Functional Histology* (Little, Brown).
- Brayden, J.E. (2002). Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 312-316. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03650.x>
- Brayden, J.E. und Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 256, 532-535. <https://doi.org/10.1126/science.1373909>
- Brueggemann, L.I., Mackie, A.R., Cribbs, L.L., Freda, J., Tripathi, A., Majetschak, M. und Byron, K.L. (2014). Differential protein kinase C-dependent modulation of Kv7.4 and Kv7.5 subunits of vascular Kv7 channels. *J Biol Chem* 289, 2099-2111. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527820>
- Brueggemann, L.I., Moran, C.J., Barakat, J.A., Yeh, J.Z., Cribbs, L.L. und Byron, K.L. (2007). Vasopressin stimulates action potential firing by protein kinase C-dependent inhibition of KCNQ5 in A7r5 rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1352-1363. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00065.2006>
- Bülbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. und Tomita, T. (1981). *Smooth muscle: an assessment of current knowledge*.
- Burns, W.R., Cohen, K.D. und Jackson, W.F. (2004). K⁺-induced dilation of hamster cremasteric arterioles involves both the Na⁺/K⁺-ATPase and inward-rectifier K⁺ channels. *Microcirculation* 11, 279-293. <https://doi.org/10.1080/10739680490425985>
- Butt, E., Pöhler, D., Genieser, H.-G., Huggins, J.P. und Bucher, B. (1995). Inhibition of cyclic GMP-dependent protein kinase-mediated effects by (Rp)-8-bromo-PET-cyclic GMPS. *British Journal of Pharmacology* 116, 3110-3116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb15112.x>
- Bychkov, R., Gollasch, M., Steinke, T., Ried, C., Luft, F.C. und Haller, H. (1998). Calcium-activated potassium channels and nitrate-induced vasodilation in human coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 285, 293-298.
- Cabell, F., Weiss, D.S. und Price, J.M. (1994). Inhibition of adenosine-induced coronary vasodilation by block of large-conductance Ca(2⁺)-activated K⁺ channels. *Am J Physiol* 267, H1455-1460. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.4.H1455>

- Chadha, P.S., Jepps, T.A., Carr, G., Stott, J.B., Zhu, H.L., Cole, W.C. und Greenwood, I.A. (2014). Contribution of kv7.4/kv7.5 heteromers to intrinsic and calcitonin gene-related peptide-induced cerebral reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 887-893. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.114.303405>
- Chen, M., Kellett, W.F. und Petkov, G.V. (2010). Voltage-gated K(+) channels sensitive to stromatoxin-1 regulate myogenic and neurogenic contractions of rat urinary bladder smooth muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299, R177-184. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00036.2010>
- Chen, T.T., Luykenaar, K.D., Walsh, E.J., Walsh, M.P. und Cole, W.C. (2006). Key role of Kv1 channels in vasoregulation. *Circulation research* 99, 53-60. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000229654.45090.57>
- Chen, X.L. und Rembold, C.M. (1996). Nitroglycerin relaxes rat tail artery primarily by lowering Ca²⁺ sensitivity and partially by repolarization. *Am J Physiol* 271, H962-968. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.3.H962>
- Cheong, A., Dedman, A.M. und Beech, D.J. (2001a). Expression and function of native potassium channel [K(V)alpha1] subunits in terminal arterioles of rabbit. *J Physiol* 534, 691-700. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00691.x>
- Cheong, A., Dedman, A.M., Xu, S.Z. und Beech, D.J. (2001b). K(V)alpha1 channels in murine arterioles: differential cellular expression and regulation of diameter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H1057-1065. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.3.H1057>
- Chilton, L., Smirnov, S.V., Loutzenhiser, K., Wang, X. und Loutzenhiser, R. (2011). Segment-specific differences in the inward rectifier K(+) current along the renal interlobular artery. *Cardiovasc Res* 92, 169-177. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr179>
- Cipolla, M.J., Sweet, J., Chan, S.L., Tavares, M.J., Gokina, N. und Brayden, J.E. (2014). Increased pressure-induced tone in rat parenchymal arterioles vs. middle cerebral arteries: role of ion channels and calcium sensitivity. *J Appl Physiol* (1985) 117, 53-59. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00253.2014>
- Cooke, J.P., Rossitch, E., Jr., Andon, N.A., Loscalzo, J. und Dzau, V.J. (1991). Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 88, 1663-1671. <https://doi.org/10.1172/jci115481>
- Cox, R.H., Folander, K. und Swanson, R. (2001). Differential expression of voltage-gated K(+) channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 37, 1315-1322. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.37.5.1315>
- Dabertrand, F., Nelson, M.T. und Brayden, J.E. (2012). Acidosis dilates brain parenchymal arterioles by conversion of calcium waves to sparks to activate BK channels. *Circulation research* 110, 285-294. <https://doi.org/10.1161/circresaha.111.258145>
- Dart, C. und Standen, N.B. (1993). Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol* 471, 767-786. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019927>

Daut, J., Klieber, H.G., Cyrus, S. und Noack, T. (1994a). KATP channels and basal coronary vascular tone. *Cardiovasc Res* 28, 811-817. <https://doi.org/10.1093/cvr/28.6.811>

Daut, J., Standen, N.B. und Nelson, M.T. (1994b). The role of the membrane potential of endothelial and smooth muscle cells in the regulation of coronary blood flow. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5, 154-181. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1994.tb01156.x>

Denninger, J.W. und Marletta, M.A. (1999). Guanylate cyclase and the ·NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411, 334-350. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00024-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00024-9)

Dick, G.M., Bratz, I.N., Borbouse, L., Payne, G.A., Dincer, U.D., Knudson, J.D., Rogers, P.A. und Tune, J.D. (2008). Voltage-dependent K⁺ channels regulate the duration of reactive hyperemia in the canine coronary circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H2371-2381. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01279.2007>

Dick, G.M. und Tune, J.D. (2010). Role of potassium channels in coronary vasodilation. *Exp Biol Med (Maywood)* 235, 10-22. <https://doi.org/10.1258/ebm.2009.009201>

Dong, H., Waldron, G.J., Galipeau, D., Cole, W.C. und Triggle, C.R. (1997). NO/PGI₂-independent vasorelaxation and the cytochrome P450 pathway in rabbit carotid artery. *Br J Pharmacol* 120, 695-701. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0700945>

Duncker, D.J., Oei, H.H., Hu, F., Stubenitsky, R. und Verdouw, P.D. (2001). Role of K(ATP)(+) channels in regulation of systemic, pulmonary, and coronary vasomotor tone in exercising swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H22-33. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.1.H22>

Edwards, F.R. und Hirst, G.D. (1988). Inward rectification in submucosal arterioles of guinea-pig ileum. *J Physiol* 404, 437-454. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017298>

Edwards, F.R., Hirst, G.D. und Silverberg, G.D. (1988). Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J Physiol* 404, 455-466. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017299>

Edwards, G., Dora, K.A., Gardener, M.J., Garland, C.J. und Weston, A.H. (1998). K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396, 269-272. <https://doi.org/10.1038/24388>

Ehrlich, J.R., Ocholla, H., Ziemek, D., Rutten, H., Hohnloser, S.H. und Gogelein, H. (2008). Characterization of human cardiac Kv1.5 inhibition by the novel atrial-selective antiarrhythmic compound AVE1231. *Journal of cardiovascular pharmacology* 51, 380-387. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181669030>

Escoubas, P., Diochot, S., Célérier, M.L., Nakajima, T. und Lazdunski, M. (2002). Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Mol Pharmacol* 62, 48-57. <https://doi.org/10.1124/mol.62.1.48>

- Fancher, I.S., Butcher, J.T., Brooks, S.D., Rottgen, T.S., Skaff, P.R., Frisbee, J.C. und Dick, G.M. (2015). Diphenyl phosphine oxide-1-sensitive K(+) channels contribute to the vascular tone and reactivity of resistance arteries from brain and skeletal muscle. *Microcirculation* 22, 315-325. <https://doi.org/10.1111/micc.12201>
- Faraci, F.M. und Sobey, C.G. (1998). Role of potassium channels in regulation of cerebral vascular tone. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 1047-1063. <https://doi.org/10.1097/00004647-199810000-00001>
- Feelisch, M. (1998). The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 358, 113-122. <https://doi.org/10.1007/PL00005231>
- Félétou, M. und Vanhoutte, P.M. (2006). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1215-1225. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000217611.81085.c5>
- Filosa, J.A., Bonev, A.D., Straub, S.V., Meredith, A.L., Wilkerson, M.K., Aldrich, R.W. und Nelson, M.T. (2006). Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci* 9, 1397-1403. <https://doi.org/10.1038/nn1779>
- Fountain, S.J., Cheong, A., Flemming, R., Mair, L., Sivaprasadarao, A. und Beech, D.J. (2004). Functional up-regulation of KCNA gene family expression in murine mesenteric resistance artery smooth muscle. *J Physiol* 556, 29-42. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058594>
- Francis, S.H., Busch, J.L., Corbin, J.D. und Sibley, D. (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 62, 525-563. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002907>
- Freed, J.K. und Gutterman, D.D. (2017). Communication Is Key: Mechanisms of Intercellular Signaling in Vasodilation. *Journal of cardiovascular pharmacology* 69, 264-272. <https://doi.org/10.1097/fjc.0000000000000463>
- Furukawa, K., Ohshima, N., Tawada-Iwata, Y. und Shigekawa, M. (1991). Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem* 266, 12337-12341.
- Gagov, H., Gribkova, I.V., Serebryakov, V.N. und Schubert, R. (2022). Sodium Nitroprusside-Induced Activation of Vascular Smooth Muscle BK Channels Is Mediated by PKG Rather Than by a Direct Interaction with NO. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23052798>
- Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J. und Garcia, M.L. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265, 11083-11090.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Nielsen, E.B., Schmidt, K. und Mayer, B. (1995). Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48, 184-188.

Ghisdal, P., Gomez, J.P. und Morel, N. (2000). Action of a NO donor on the excitation-contraction pathway activated by noradrenaline in rat superior mesenteric artery. *J Physiol* 522 Pt 1, 83-96. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-3-00083.x>

Gille, U. (2008). Herz-Kreislauf- und Abwehrsystem, *Angiologia*. In *Anatomie für die Tiermedizin*, F.-V. Salomon, H. Geyer, und U. Gille, Hrsg. (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).

Goldstein, S.A., Bockenhauer, D., O'Kelly, I. und Zilberberg, N. (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2, 175-184. <https://doi.org/10.1038/35058574>

Gollasch, M., Löhn, M., Furstenau, M., Nelson, M.T., Luft, F.C. und Haller, H. (2000). Ca²⁺ channels, 'quantized' Ca²⁺ release, and differentiation of myocytes in the cardiovascular system. *Journal of hypertension* 18, 989-998. <https://doi.org/10.1097/00004872-200018080-00001>

Greenwood, I.A. und Ohya, S. (2009a). New tricks for old dogs: KCNQ expression and role in smooth muscle. *Br J Pharmacol* 156, 1196-1203. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00131.x>

Greenwood, I.A. und Ohya, S. (2009b). New tricks for old dogs: KCNQ expression and role in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 156, 1196-1203. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00131.x>

Gribkova, I.V., Schubert, R. und Serebriakov, V.N. (2002). [Study of NO action on calcium-activated potassium channel of the rat artery smooth muscle cells]. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal imeni IM Sechenova* 88, 1199-1205.

Guyton, A.C. (1981). The relationship of cardiac output and arterial pressure control. *Circulation* 64, 1079-1088. <https://doi.org/10.1161/01.cir.64.6.1079>

Hagiwara, S., Miyazaki, S., Moody, W. und Patlak, J. (1978). Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg. *The Journal of Physiology* 279, 167-185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012338>

Hansen, P.R. und Olesen, S.P. (1997). Relaxation of rat resistance arteries by acetylcholine involves a dual mechanism: activation of K⁺ channels and formation of nitric oxide. *Pharmacol Toxicol* 80, 280-285. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1997.tb01974.x>

Hayabuchi, Y., Standen, N.B. und Davies, N.W. (2001). Angiotensin II inhibits and alters kinetics of voltage-gated K(+) channels of rat arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H2480-2489. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.6.H2480>

Hayoz, S., Bradley, V., Boerman, E.M., Nourian, Z., Segal, S.S. und Jackson, W.F. (2014). Aging increases capacitance and spontaneous transient outward current amplitude of smooth muscle cells from murine superior epigastric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306, H1512-1524. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00492.2013>

Hedegaard, E.R., Nielsen, B.D., Kun, A., Hughes, A.D., Krøigaard, C., Mogensen, S., Matchkov, V.V., Frøbert, O. und Simonsen, U. (2014). KV 7 channels are involved in hypoxia-induced vasodilatation of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 171, 69-82. <https://doi.org/10.1111/bph.12424>

Hein, T.W., Xu, W., Ren, Y. und Kuo, L. (2013). Cellular signalling pathways mediating dilation of porcine pial arterioles to adenosine A₂A receptor activation. *Cardiovasc Res* 99, 156-163. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt072>

Hernanz, R., Alonso, M.J., Baena, A.B., Salaices, M., Alvarez, L., Castillo-Olivares, J.L. und Marín, J. (1999). Mechanisms involved in relaxation induced by exogenous nitric oxide in pig coronary arteries. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21, 155-160. <https://doi.org/10.1358/mf.1999.21.3.534823>

Herold, G. (2023). *Innere Medizin 2023* (Berlin, Boston: De Gruyter).

Hille, B. (1978). Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. *Biophysical Journal* 22, 283-294. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(78\)85489-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-3495(78)85489-7)

Hirst, G.D. und Edwards, F.R. (1989). Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev* 69, 546-604. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.2.546>

Hirst, G.D., Silverberg, G.D. und van Helden, D.F. (1986). The action potential and underlying ionic currents in proximal rat middle cerebral arterioles. *J Physiol* 371, 289-304. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp015975>

Homer, K.L. und Wanstall, J.C. (2000). Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor. *Br J Pharmacol* 131, 673-682. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703613>

Hong, K.W., Yoo, S.E., Yu, S.S., Lee, J.Y. und Rhim, B.Y. (1996). Pharmacological coupling and functional role for CGRP receptors in the vasodilation of rat pial arterioles. *Am J Physiol* 270, H317-323. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.270.1.H317>

Hottinger, D.G., Beebe, D.S., Kozhimannil, T., Prielipp, R.C. und Belani, K.G. (2014). Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 30, 462-471. <https://doi.org/10.4103/0970-9185.142799>

Howitt, L., Sandow, S.L., Grayson, T.H., Ellis, Z.E., Morris, M.J. und Murphy, T.V. (2011). Differential effects of diet-induced obesity on BKCa {beta}1-subunit expression and function in rat skeletal muscle arterioles and small cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H29-40. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00134.2011>

Huang, C.-W. und Kuo, C.-C. (2016). A synergistic blocking effect of Mg²⁺ and spermine on the inward rectifier K⁺ (Kir2.1) channel pore. *Scientific Reports* 6, 21493. <https://doi.org/10.1038/srep21493>

Ignarro, L.J. (2002). Wei Lun Visiting Professorial Lecture: Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview. *J Card Surg* 17, 301-306.

Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A. und Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *Journal of cardiovascular pharmacology* 34, 879-886. <https://doi.org/10.1097/00005344-199912000-00016>

Imamura, Y., Tomoike, H., Narishige, T., Takahashi, T., Kasuya, H. und Takeshita, A. (1992). Glibenclamide decreases basal coronary blood flow in anesthetized dogs. *Am J Physiol* 263, H399-404. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.263.2.H399>

Jackson, W.F. (1993). Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 265, H1797-1803. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.265.5.H1797>

Jackson, W.F. (1998). Potassium channels and regulation of the microcirculation. *Microcirculation* 5, 85-90.

Jackson, W.F. (2000). Ion channels and vascular tone. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 35, 173-178. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.1.173>

Jackson, W.F. (2018). K(V) channels and the regulation of vascular smooth muscle tone. *Microcirculation* 25. <https://doi.org/10.1111/micc.12421>

Jackson, W.F., Huebner, J.M. und Rusch, N.J. (1997). Enzymatic isolation and characterization of single vascular smooth muscle cells from cremasteric arterioles. *Microcirculation* 4, 35-50. <https://doi.org/10.3109/10739689709148316>

Jackson, W.F., König, A., Dambacher, T. und Busse, R. (1993). Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 264, H238-243. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.264.1.H238>

Jackson-Weaver, O., Paredes, D.A., Gonzalez Bosc, L.V., Walker, B.R. und Kanagy, N.L. (2011). Intermittent hypoxia in rats increases myogenic tone through loss of hydrogen sulfide activation of large-conductance Ca(2+)-activated potassium channels. *Circulation research* 108, 1439-1447. <https://doi.org/10.1161/circresaha.110.228999>

Jaggat, J.H., Porter, V.A., Lederer, W.J. und Nelson, M.T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C235-256. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C235>

Jensen, H.S., Callø, K., Jespersen, T., Jensen, B.S. und Olesen, S.P. (2005). The KCNQ5 potassium channel from mouse: a broadly expressed M-current like potassium channel modulated by zinc, pH, and volume changes. *Brain Res Mol Brain Res* 139, 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.05.007>

Jepps, T.A., Olesen, S.P. und Greenwood, I.A. (2013). One man's side effect is another man's therapeutic opportunity: targeting Kv7 channels in smooth muscle disorders. *Br J Pharmacol* 168, 19-27. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02133.x>

Joshi, S., Balan, P. und Gurney, A.M. (2006). Pulmonary vasoconstrictor action of KCNQ potassium channel blockers. *Respir Res* 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-31>

- Kaczorowski, G.J., Knaus, H.G., Leonard, R.J., McManus, O.B. und Garcia, M.L. (1996). High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg Biomembr* 28, 255-267. <https://doi.org/10.1007/bf02110699>
- Kang, L.S., Kim, S., Dominguez, J.M., 2nd, Sindler, A.L., Dick, G.M. und Muller-Delp, J.M. (2009). Aging and muscle fiber type alter K⁺ channel contributions to the myogenic response in skeletal muscle arterioles. *J Appl Physiol* (1985) 107, 389-398. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91245.2008>
- Karaki, H., Sato, K., Ozaki, H. und Murakami, K. (1988). Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology* 156, 259-266. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90329-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90329-9)
- Khalil, R., Lodge, N., Saida, K. und van Breemen, C. (1987). Mechanism of calcium activation in vascular smooth muscle. *J Hypertens Suppl* 5, S5-15.
- Khan, S.A., Mathews, W.R. und Meisheri, K.D. (1993). Role of calcium-activated K⁺ channels in vasodilation induced by nitroglycerine, acetylcholine and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 1327-1335.
- Khanamiri, S., Soltysinska, E., Jepps, T.A., Bentzen, B.H., Chadha, P.S., Schmitt, N., Greenwood, I.A. und Olesen, S.P. (2013). Contribution of Kv7 channels to basal coronary flow and active response to ischemia. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 62, 1090-1097. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.113.01244>
- Kilpatrick, E.V. und Cocks, T.M. (1994). Evidence for differential roles of nitric oxide (NO) and hyperpolarization in endothelium-dependent relaxation of pig isolated coronary artery. *Br J Pharmacol* 112, 557-565. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb13110.x>
- Kiper, A.K., Rinne, S., Rolfes, C., Ramirez, D., Seebohm, G., Netter, M.F., Gonzalez, W. und Decher, N. (2015). Kv1.5 blockers preferentially inhibit TASK-1 channels: TASK-1 as a target against atrial fibrillation and obstructive sleep apnea? *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467, 1081-1090. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1665-1>
- Knot, H.J., Zimmermann, P.A. und Nelson, M.T. (1996). Extracellular K⁽⁺⁾-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K⁽⁺⁾ channels. *J Physiol* 492 (Pt 2), 419-430. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021318>
- Kokita, N., Stekiel, T.A., Yamazaki, M., Bosnjak, Z.J., Kampine, J.P. und Stekiel, W.J. (1999). Potassium channel-mediated hyperpolarization of mesenteric vascular smooth muscle by isoflurane. *Anesthesiology* 90, 779-788. <https://doi.org/10.1097/0000542-199903000-00021>
- Komalavilas, P. und Lincoln, T.M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* 271, 21933-21938. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.36.21933>

Kotecha, N. und Hill, M.A. (2005). Myogenic contraction in rat skeletal muscle arterioles: smooth muscle membrane potential and Ca(2+) signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H1326-1334. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00323.2005>

Kreye, V.A.W. und Reske, S.N. (1982). Natrium-Nitroprussid: Hinweise für eine rasche In-vivo-Inaktivierung in peripheren Gefäßbetten. Präsentiert bei: Nitrate III (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Kruszyna, H., Magyar, J.S., Rochelle, L.G., Russell, M.A., Smith, R.P. und Wilcox, D.E. (1998). Spectroscopic studies of nitric oxide (NO) interactions with cobalamins: reaction of NO with superoxocobalamin(III) likely accounts for cobalamin reversal of the biological effects of NO. *J Pharmacol Exp Ther* 285, 665-671.

Kummer, W. und Welsch, U. (2014). Organe des Kreislaufes und Lymphgefäße. In *Lehrbuch Histologie*, U. Welsch, und T. Deller, Hrsg. (München: Elsevier, Urban & Fischer), S. 233 - 252.

Lagrutta, A., Wang, J., Fermini, B. und Salata, J.J. (2006). Novel, potent inhibitors of human Kv1.5 K⁺ channels and ultrarapidly activating delayed rectifier potassium current. *J Pharmacol Exp Ther* 317, 1054-1063. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.101162>

Larsen, R. (2012). Kardiovaskuläre Medikamente. In *Anästhesie und Intensivmedizin in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), S. 40 - 44.

Latorre, R., Castillo, K., Carrasquel-Ursulaez, W., Sepulveda, R.V., Gonzalez-Nilo, F., Gonzalez, C. und Alvarez, O. (2017). Molecular Determinants of BK Channel Functional Diversity and Functioning. *Physiol Rev* 97, 39-87. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2016>

Lu, Y., Hanna, S.T., Tang, G. und Wang, R. (2002). Contributions of Kv1.2, Kv1.5 and Kv2.1 subunits to the native delayed rectifier K(+) current in rat mesenteric artery smooth muscle cells. *Life Sci* 71, 1465-1473. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)01922-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(02)01922-7)

Lu, Z. (2004). Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu Rev Physiol* 66, 103-129. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.150822>

Lucchesi, P.A., Belmadani, S. und Matrougui, K. (2005). Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *Journal of hypertension* 23, 571-579. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000160214.40855.79>

Ma, D., Gaynullina, D., Schmidt, N., Mladenov, M. und Schubert, R. (2020). The Functional Availability of Arterial Kv7 Channels Is Suppressed Considerably by Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channels in 2- to 3-Month Old but Not in 10- to 15-Day Old Rats. *Front Physiol* 11, 597395. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.597395>

Mackie, A.R., Brueggemann, L.I., Henderson, K.K., Shiels, A.J., Cribbs, L.L., Scrogin, K.E. und Byron, K.L. (2008). Vascular KCNQ potassium channels as novel targets for the control of mesenteric artery constriction by vasopressin, based on studies in single

cells, pressurized arteries, and in vivo measurements of mesenteric vascular resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 475-483. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.135764>

Mackie, A.R. und Byron, K.L. (2008). Cardiovascular KCNQ (Kv7) potassium channels: physiological regulators and new targets for therapeutic intervention. *Mol Pharmacol* 74, 1171-1179. <https://doi.org/10.1124/mol.108.049825>

Magnusson, L., Sorensen, C.M., Braunstein, T.H., Holstein-Rathlou, N.H. und Salomonsson, M. (2007). Renovascular BK(Ca) channels are not activated in vivo under resting conditions and during agonist stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R345-353. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00337.2006>

Mandalà, M., Heppner, T.J., Bonev, A.D. und Nelson, M.T. (2007). Effect of endogenous and exogenous nitric oxide on calcium sparks as targets for vasodilation in rat cerebral artery. *Nitric Oxide* 16, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.06.007>

Martinsen, A., Dessy, C. und Morel, N. (2014). Regulation of calcium channels in smooth muscle: new insights into the role of myosin light chain kinase. *Channels (Austin)* 8, 402-413. <https://doi.org/10.4161/19336950.2014.950537>

Mayhan, W.G. und Faraci, F.M. (1993). Responses of cerebral arterioles in diabetic rats to activation of ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 265, H152-157. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1993.265.1.H152>

McCarron, J.G. und Halpern, W. (1990). Potassium dilates rat cerebral arteries by two independent mechanisms. *Am J Physiol* 259, H902-908. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.3.H902>

Miller, M.R. und Megson, I.L. (2007). Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol* 151, 305-321. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707224>

Miller, M.R., Okubo, K., Roseberry, M.J., Webb, D.J. und Megson, I.L. (2004). Extracellular nitric oxide release mediates soluble guanylate cyclase-independent vasodilator action of spermine NONOate: comparison with other nitric oxide donors in isolated rat femoral arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology* 43, 440-451. <https://doi.org/10.1097/00005344-200403000-00016>

Minkes, R.K., Santiago, J.A., McMahon, T.J. und Kadowitz, P.J. (1995). Role of K⁺ATP channels and EDRF in reactive hyperemia in the hindquarters vascular bed of cats. *Am J Physiol* 269, H1704-1712. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1995.269.5.H1704>

Mistry, D.K. und Garland, C.J. (1998). Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 124, 1131-1140. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701940>

Miyoshi, H., Nakaya, Y. und Moritoki, H. (1994). Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K⁺ channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 345, 47-49. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00417-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00417-x)

Moreno-Domínguez, A., Ciudad, P., Miguel-Velado, E., López-López, J.R. und Pérez-García, M.T. (2009). De novo expression of Kv6.3 contributes to changes in vascular smooth muscle cell excitability in a hypertensive mice strain. *J Physiol* 587, 625-640. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165217>

Mori, A., Suzuki, S., Sakamoto, K., Nakahara, T. und Ishii, K. (2011). BMS-191011, an opener of large-conductance Ca²⁺-activated potassium channels, dilates rat retinal arterioles in vivo. *Biol Pharm Bull* 34, 150-152. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.150>

Mulvany, M.J. und Halpern, W. (1976). Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature* 260, 617-619.

Mulvany, M.J. und Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation research* 41, 19-26.

Murphy, M.E. und Brayden, J.E. (1995). Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol* 486 (Pt 1), 47-58. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020789>

Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S.K., Steppan, J., Jung, S.M., Bhunia, A.K., Barodka, V.M., Gazi, F.K., Barrow, R.K., Wang, R., *et al.* (2011). Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circulation research* 109, 1259-1268. <https://doi.org/10.1161/circresaha.111.240242>

Nagaoka, T., Hein, T.W., Yoshida, A. und Kuo, L. (2007). Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 4232-4239. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0094>

Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J. und Lederer, W.J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270, 633-637. <https://doi.org/10.1126/science.270.5236.633>

Nelson, M.T. und Quayle, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268, C799-822. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.4.C799>

Ng, F.L., Davis, A.J., Jepps, T.A., Harhun, M.I., Yeung, S.Y., Wan, A., Reddy, M., Melville, D., Nardi, A., Khong, T.K., *et al.* (2011). Expression and function of the K⁺ channel KCNQ genes in human arteries. *Br J Pharmacol* 162, 42-53. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01027.x>

Ohya, S., Sergeant, G.P., Greenwood, I.A. und Horowitz, B. (2003). Molecular variants of KCNQ channels expressed in murine portal vein myocytes: a role in delayed rectifier current. *Circulation research* 92, 1016-1023. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000070880.20955.F4>

Onoue, H. und Katusic, Z.S. (1997). Role of potassium channels in relaxations of canine middle cerebral arteries induced by nitric oxide donors. *Stroke* 28, 1264-1270; discussion 1270-1261. <https://doi.org/10.1161/01.str.28.6.1264>

- Overturf, K.E., Russell, S.N., Carl, A., Vogalis, F., Hart, P.J., Hume, J.R., Sanders, K.M. und Horowitz, B. (1994). Cloning and characterization of a Kv1.5 delayed rectifier K⁺ channel from vascular and visceral smooth muscles. *Am J Physiol* 267, C1231-1238. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.267.5.C1231>
- Palmer, R.M., Ashton, D.S. und Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664-666. <https://doi.org/10.1038/333664a0>
- Park, W.S., Han, J. und Earm, Y.E. (2008). Physiological role of inward rectifier K⁽⁺⁾ channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457, 137-147. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0512-7>
- Paternò, R., Faraci, F.M. und Heistad, D.D. (1996). Role of Ca⁽²⁺⁾-dependent K⁺ channels in cerebral vasodilatation induced by increases in cyclic GMP and cyclic AMP in the rat. *Stroke* 27, 1603-1607; discussion 1607-1608. <https://doi.org/10.1161/01.str.27.9.1603>
- Paternò, R., Heistad, D.D. und Faraci, F.M. (1997). Functional activity of Ca²⁺-dependent K⁺ channels is increased in basilar artery during chronic hypertension. *Am J Physiol* 272, H1287-1291. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.3.H1287>
- Pfitzer, G. und Hescheler, J. (2013). Glatte Muskulatur. In *Physiologie*, E.-J. Speckmann, J. Hescheler, und R. Köhling, Hrsg. (München: Elsevier, Urban & Fischer), S. 189 - 197.
- Plane, F., Hurrell, A., Jeremy, J.Y. und Garland, C.J. (1996). Evidence that potassium channels make a major contribution to SIN-1-evoked relaxation of rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 119, 1557-1562. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb16072.x>
- Plane, F., Johnson, R., Kerr, P., Wiehler, W., Thorneloe, K., Ishii, K., Chen, T. und Cole, W. (2005). Heteromultimeric Kv1 channels contribute to myogenic control of arterial diameter. *Circulation research* 96, 216-224. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000154070.06421.25>
- Plane, F., Wiley, K.E., Jeremy, J.Y., Cohen, R.A. und Garland, C.J. (1998). Evidence that different mechanisms underlie smooth muscle relaxation to nitric oxide and nitric oxide donors in the rabbit isolated carotid artery. *Br J Pharmacol* 123, 1351-1358. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701746>
- Porter, V.A., Bonev, A.D., Knot, H.J., Heppner, T.J., Stevenson, A.S., Kleppisch, T., Lederer, W.J. und Nelson, M.T. (1998). Frequency modulation of Ca²⁺ sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol* 274, C1346-1355. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.5.C1346>
- Price, J.M. und Hellermann, A. (1997). Inhibition of cGMP mediated relaxation in small rat coronary arteries by block of CA⁺⁺ activated K⁺ channels. *Life Sci* 61, 1185-1192. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)00660-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)00660-7)
- Prior, H.M., Webster, N., Quinn, K., Beech, D.J. und Yates, M.S. (1998a). K⁺-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K⁺ channels. *Cardiovascular Research* 37, 780-790. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00237-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00237-x)

- Prior, H.M., Yates, M.S. und Beech, D.J. (1998b). Functions of large conductance Ca²⁺-activated (BKCa), delayed rectifier (KV) and background K⁺ channels in the control of membrane potential in rabbit renal arcuate artery. *J Physiol* 511 (Pt 1), 159-169. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.159bi.x>
- Pugsley, M.K. und Tabrizchi, R. (2000). The vascular system: An overview of structure and function. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 44, 333-340. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00125-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00125-8)
- Putzke, C., Wemhöner, K., Sachse, F.B., Rinné, S., Schlichthörl, G., Li, X.T., Jaé, L., Eckhardt, I., Wischmeyer, E., Wulf, H., *et al.* (2007). The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 75, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.02.025>
- Quast, U., Bray, K.M., Baumlin, Y. und Dosogne, J. (1992). Potassium Channel Openers: Pharmacology and Therapeutic Prospects. In *Pharmacochemistry Library*, P. Angeli, U. Gulini, und W. Quaglia, Hrsg. (Elsevier), S. 309-332.
- Quayle, J.M., Dart, C. und Standen, N.B. (1996). The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol* 494 (Pt 3), 715-726. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021527>
- Quayle, J.M., McCarron, J.G., Brayden, J.E. und Nelson, M.T. (1993). Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 265, C1363-1370. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.5.C1363>
- Quayle, J.M., Nelson, M.T. und Standen, N.B. (1997). ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 77, 1165-1232. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.4.1165>
- Rettig, R. und Kuschinsky, W. (2013). Kreislauf. In *Physiologie* (München: Elsevier, Urban & Fischer), S. 402 - 408, 414 - 418.
- Rivers, R.J., Hein, T.W., Zhang, C. und Kuo, L. (2001). Activation of barium-sensitive inward rectifier potassium channels mediates remote dilation of coronary arterioles. *Circulation* 104, 1749-1753. <https://doi.org/10.1161/hc4001.098053>
- Robbins, J. (2001). KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 90, 1-19. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(01\)00116-4](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(01)00116-4)
- Robertson, B.E., Bonev, A.D. und Nelson, M.T. (1996). Inward rectifier K⁺ currents in smooth muscle cells from rat coronary arteries: block by Mg²⁺, Ca²⁺, and Ba²⁺. *Am J Physiol* 271, H696-705. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.2.H696>
- Robertson, B.E., Schubert, R., Hescheler, J. und Nelson, M.T. (1993). cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265, C299-303. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.1.C299>
- Rogers, P.A., Chilian, W.M., Bratz, I.N., Bryan, R.M., Jr. und Dick, G.M. (2007a). H₂O₂ activates redox- and 4-aminopyridine-sensitive Kv channels in coronary vascular

smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1404-1411. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00696.2006>

Rogers, P.A., Chilian, W.M., Bratz, I.N., Bryan, R.M.J. und Dick, G.M. (2007b). H₂O₂ activates redox- and 4-aminopyridine-sensitive Kv channels in coronary vascular smooth muscle.

Ruth, P., Wang, G.X., Boekhoff, I., May, B., Pfeifer, A., Penner, R., Korth, M., Breer, H. und Hofmann, F. (1993). Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2623-2627. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.2623>

Saito, Y., McKay, M., Eraslan, A. und Hester, R.L. (1996). Functional hyperemia in striated muscle is reduced following blockade of ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 270, H1649-1654. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.270.5.H1649>

Samaha, F.F., Heineman, F.W., Ince, C., Fleming, J. und Balaban, R.S. (1992). ATP-sensitive potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo. *Am J Physiol* 262, C1220-1227. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1992.262.5.C1220>

Samora, J.B., Frisbee, J.C. und Boegehold, M.A. (2007). Growth-dependent changes in endothelial factors regulating arteriolar tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H207-214. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00677.2006>

Schleifenbaum, J., Kohn, C., Voblova, N., Dubrovskaya, G., Zavarirskaya, O., Gloe, T., Crean, C.S., Luft, F.C., Huang, Y., Schubert, R., *et al.* (2010). Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *Journal of hypertension* 28, 1875-1882. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32833c20d5>

Schmid, J., Müller, B., Heppeler, D., Gaynullina, D., Kassmann, M., Gagov, H., Mladenov, M., Gollasch, M. und Schubert, R. (2018). The Unexpected Role of Calcium-Activated Potassium Channels: Limitation of NO-Induced Arterial Relaxation. *Journal of the American Heart Association* 7. <https://doi.org/10.1161/jaha.117.007808>

Schubert, R., Krien, U., Wulfsen, I., Schiemann, D., Lehmann, G., Ulfing, N., Veh, R.W., Schwarz, J.R. und Gago, H. (2004). Nitric oxide donor sodium nitroprusside dilates rat small arteries by activation of inward rectifier potassium channels. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 43, 891-896. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000121882.42731.6b>

Schubert, R. und Nelson, M.T. (2001). Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci* 22, 505-512. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)01775-2](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)01775-2)

Schubert, R., Serebryakov, V.N., Mewes, H. und Hopp, H.H. (1997). Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 272, H1147-1156. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.3.H1147>

Shvetsova, A.A., Gaynullina, D.K., Tarasova, O.S. und Schubert, R. (2019). Negative feedback regulation of vasoconstriction by potassium channels in 10- to 15-day-old

rats: Dominating role of Kv7 channels. *Acta Physiologica* 225, e13176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/apha.13176>

Simonsen, U., Prieto, D., Sáñez de Tejada, I. und García-Sacristán, A. (1995). Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K(+)-channels. *Br J Pharmacol* 116, 2582-2590. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1995.tb17211.x>

Smirnov, S.V., Beck, R., Tamaro, P., Ishii, T. und Aaronson, P.I. (2002). Electrophysiologically distinct smooth muscle cell subtypes in rat conduit and resistance pulmonary arteries. *J Physiol* 538, 867-878. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013003>

Smith, P.D., Brett, S.E., Luykenaar, K.D., Sandow, S.L., Marrelli, S.P., Vigmond, E.J. und Welsh, D.G. (2008). KIR channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle. *J Physiol* 586, 1147-1160. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.145474>

Sobey, C.G. (2001). Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 28-38. <https://doi.org/10.1161/01.atv.21.1.28>

Sobey, C.G. und Faraci, F.M. (1999). Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacol* 126, 1437-1443. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702439>

Standen, N.B., Quayle, J.M., Davies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y. und Nelson, M.T. (1989). Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 245, 177-180. <https://doi.org/10.1126/science.2501869>

Stott, J.B., Barrese, V., Jepps, T.A., Leighton, E.V. und Greenwood, I.A. (2015). Contribution of Kv7 Channels to Natriuretic Peptide Mediated Vasodilation in Normal and Hypertensive Rats. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 65, 676-682. <https://doi.org/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04373>

Stott, J.B. und Greenwood, I.A. (2015). Complex role of Kv7 channels in cGMP and cAMP-mediated relaxations. *Channels (Austin)* 9, 117-118. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1046732>

Stott, J.B., Jepps, T.A. und Greenwood, I.A. (2014). K(V)7 potassium channels: a new therapeutic target in smooth muscle disorders. *Drug Discov Today* 19, 413-424. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.12.003>

Streit, A.K., Netter, M.F., Kempf, F., Walecki, M., Rinne, S., Bollepalli, M.K., Preisig-Muller, R., Renigunta, V., Daut, J., Baukrowitz, T., *et al.* (2011). A specific two-pore domain potassium channel blocker defines the structure of the TASK-1 open pore. *J Biol Chem* 286, 13977-13984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227884>

Stump, G.L., Wallace, A.A., Regan, C.P. und Lynch, J.J., Jr. (2005). In vivo antiarrhythmic and cardiac electrophysiologic effects of a novel diphenylphosphine oxide IK_{ur} blocker (2-isopropyl-5-methylcyclohexyl) diphenylphosphine oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 1362-1367. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.092197>

- Sun, C.W., Falck, J.R., Okamoto, H., Harder, D.R. und Roman, R.J. (2000). Role of cGMP versus 20-HETE in the vasodilator response to nitric oxide in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H339-350. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.1.H339>
- Tammaro, P., Smith, A.L., Hutchings, S.R. und Smirnov, S.V. (2004). Pharmacological evidence for a key role of voltage-gated K⁺ channels in the function of rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 143, 303-317. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705957>
- Tanaka, Y., Tang, G., Takizawa, K., Otsuka, K., Eghbali, M., Song, M., Nishimaru, K., Shigenobu, K., Koike, K., Stefani, E., *et al.* (2006). Kv channels contribute to nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-induced relaxation of a rat conduit artery. *J Pharmacol Exp Ther* 317, 341-354. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.096115>
- Tanano, I., Nagaoka, T., Omae, T., Ishibazawa, A., Kamiya, T., Ono, S. und Yoshida, A. (2013). Dilation of Porcine Retinal Arterioles to Cilostazol: Roles of eNOS Phosphorylation via cAMP/Protein Kinase A and AMP-Activated Protein Kinase and Potassium Channels. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54, 1443-1449. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10115>
- Tateishi, J. und Faber, J.E. (1995). ATP-sensitive K⁺ channels mediate alpha 2D-adrenergic receptor contraction of arteriolar smooth muscle and reversal of contraction by hypoxia. *Circulation research* 76, 53-63. <https://doi.org/10.1161/01.res.76.1.53>
- Thomas, G.D., Hansen, J. und Victor, R.G. (1997). ATP-sensitive potassium channels mediate contraction-induced attenuation of sympathetic vasoconstriction in rat skeletal muscle. *J Clin Invest* 99, 2602-2609. <https://doi.org/10.1172/jci119448>
- Thorneloe, K.S. und Nelson, M.T. (2005). Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol* 83, 215-242. <https://doi.org/10.1139/y05-016>
- Trendelenburg, U., Maxwell, R.A. und Pluchino, S. (1970). Methoxamine as a tool to assess the importance of intraneuronal uptake of l-norepinephrine in the cat's nictitating membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 172, 91-99.
- Tsvetkov, D., Tano, J.Y., Kassmann, M., Wang, N., Schubert, R. und Gollasch, M. (2016). The Role of DPO-1 and XE991-Sensitive Potassium Channels in Perivascular Adipose Tissue-Mediated Regulation of Vascular Tone. *Front Physiol* 7, 335. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00335>
- Tykocki, N.R., Boerman, E.M. und Jackson, W.F. (2017a). Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol* 7, 485-581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
- Tykocki, N.R., Bonev, A.D., Longden, T.A., Heppner, T.J. und Nelson, M.T. (2017b). Inhibition of vascular smooth muscle inward-rectifier K⁽⁺⁾ channels restores myogenic tone in mouse urinary bladder arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol* 312, F836-F847. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00682.2016>
- Ungvari, Z. und Koller, A. (2001). Mediation of EDHF-induced reduction of smooth muscle [Ca⁽²⁺⁾]_i and arteriolar dilation by K⁽⁺⁾ channels, 5,6-EET, and gap junctions. *Microcirculation* 8, 265-274. <https://doi.org/10.1038/sj/mn/7800080>

- Vallet, B., Curtis, S.E., Guery, B., Mangalaboyi, J., Menager, P., Cain, S.M., Chopin, C. und Dupuis, B.A. (1995). ATP-sensitive K⁺ channel blockade impairs O₂ extraction during progressive ischemia in pig hindlimb. *J Appl Physiol* (1985) 79, 2035-2042. <https://doi.org/10.1152/jappl.1995.79.6.2035>
- Vanelli, G., Chang, H.Y., Gatensby, A.G. und Hussain, S.N. (1994). Contribution of potassium channels to active hyperemia of the canine diaphragm. *J Appl Physiol* (1985) 76, 1098-1105. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.76.3.1098>
- Vanelli, G. und Hussain, S.N. (1994). Effects of potassium channel blockers on basal vascular tone and reactive hyperemia of canine diaphragm. *Am J Physiol* 266, H43-51. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.266.1.H43>
- Webb, R.C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27, 201-206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>
- Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S. und Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 463-472. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.9>
- Wei, E.P., Kontos, H.A. und Beckman, J.S. (1996). Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol* 271, H1262-1266. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.271.3.H1262>
- Wellman, G.C., Bonev, A.D., Nelson, M.T. und Brayden, J.E. (1996). Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Circulation research* 79, 1024-1030. <https://doi.org/10.1161/01.res.79.5.1024>
- Welsch, U. und Deller, T. (2014). Muskelgewebe. In *Lehrbuch Histologie*, U. Welsch, und T. Deller, Hrsg. (München: Elsevier, Urban & Fischer), S. 153 - 157.
- Westcott, E.B., Goodwin, E.L., Segal, S.S. und Jackson, W.F. (2012). Function and expression of ryanodine receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in smooth muscle cells of murine feed arteries and arterioles. *J Physiol* 590, 1849-1869. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.222083>
- Westcott, E.B. und Jackson, W.F. (2011). Heterogeneous function of ryanodine receptors, but not IP₃ receptors, in hamster cremaster muscle feed arteries and arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H1616-1630. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00728.2010>
- Wu, C.C., Chen, S.J. und Garland, C.J. (2004). NO and KATP channels underlie endotoxin-induced smooth muscle hyperpolarization in rat mesenteric resistance arteries. *Br J Pharmacol* 142, 479-484. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705794>
- Wu, X. und Davis, M.J. (2001). Characterization of stretch-activated cation current in coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1751-1761. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1751>
- Wu, X., Somlyo, A.V. und Somlyo, A.P. (1996). Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate.

Biochemical and biophysical research communications 220, 658-663.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0460>

Yashiro, Y. und Duling, B.R. (2003). Participation of intracellular Ca²⁺ stores in arteriolar conducted responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H65-73.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00662.2002>

Yeung, S.Y. und Greenwood, I.A. (2005). Electrophysiological and functional effects of the KCNQ channel blocker XE991 on murine portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 146, 585-595. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706342>

Yeung, S.Y., Pucovský, V., Moffatt, J.D., Saldanha, L., Schwake, M., Ohya, S. und Greenwood, I.A. (2007). Molecular expression and pharmacological identification of a role for K(v)7 channels in murine vascular reactivity. *Br J Pharmacol* 151, 758-770.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707284>

Zhang, D., Krause, B.M., Schmalz, H.G., Wohlfart, P., Yard, B.A. und Schubert, R. (2021). ET-CORM Mediated Vasorelaxation of Small Mesenteric Arteries: Involvement of Kv7 Potassium Channels. *Front Pharmacol* 12, 702392.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.702392>

Zhao, Y.J., Wang, J., Rubin, L.J. und Yuan, X.J. (1997). Inhibition of K(V) and K(Ca) channels antagonizes NO-induced relaxation in pulmonary artery. *Am J Physiol* 272, H904-912. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.272.2.H904>

Zhong, X.Z., Abd-Elrahman, K.S., Liao, C.H., El-Yazbi, A.F., Walsh, E.J., Walsh, M.P. und Cole, W.C. (2010a). Stromatoxin-sensitive, heteromultimeric Kv2.1/Kv9.3 channels contribute to myogenic control of cerebral arterial diameter. *J Physiol* 588, 4519-4537. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.196618>

Zhong, X.Z., Harhun, M.I., Olesen, S.P., Ohya, S., Moffatt, J.D., Cole, W.C. und Greenwood, I.A. (2010b). Participation of KCNQ (Kv7) potassium channels in myogenic control of cerebral arterial diameter. *J Physiol* 588, 3277-3293.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.192823>

Zhu, P., Bény, J.L., Flammer, J., Lüscher, T.F. und Haefliger, I.O. (1997). Relaxation by bradykinin in porcine ciliary artery. Role of nitric oxide and K(+)-channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1761-1767.

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Peter Reinhold Winkler
Geburtsdatum: 16. Mai 1988
Geburtsort: Heppenheim (Kreis Bergstraße, Hessen)
Familienstand: geschieden
Vater: Friedrich Winkler
Mutter: Ulrike Winkler

SCHULISCHER WERDEGANG

1994 – 1998 Grundschule Schillerschule Bürstadt
1998 – 2004 Gymnasialer Zweig der Erich Kästner-Schule Bürstadt
2004 – 2007 Lessing-Gymnasium Lampertheim
14. Juni 2007 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

Oktober 2014 Beginn des Studiums Humanmedizin an der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
September 2019 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2021 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 2021 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29. Juni 2021 Approbation

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Schubert für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit, diese unter seiner Leitung zu erstellen. Seine exzellente Betreuung während und auch nach der experimentellen Phase im Labor, die regelmäßigen Rücksprachen und sein allzeit offenes Ohr für Fragen waren eine enorme Hilfe bei der Ausarbeitung dieser Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich Frau Camela Jost und Frau Sarah Albrecht, die mich mit viel Geduld und großer Güte in die Tätigkeit im Labor eingeführt haben und mir wichtige sowie sachdienliche Hinweise gaben.

Ebenso danke ich Herrn Patrick Bayer und Herrn Jan Freytag für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen wertvollen Hinweise und Anregungen, die zur Vollendung derselben geführt haben.

Mein persönlicher Dank geht zudem an meine Eltern Ulrike und Friedrich Winkler und meine Lebensgefährtin Stefanie Thieser, die mich durch die anspruchsvolle Zeit des Studiums der Humanmedizin und bei der Erstellung dieser Arbeit in jeder Hinsicht begleitetet und voller Hingabe unterstützt haben.