

**Oxidativer Stress und Gefäßfunktion:
Untersuchungen zum Einfluss von
Hydroperoxiden auf Kontraktion und
Endothelfunktion in Arterien**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2004

**vorgelegt von
Anneke Blumenstein**

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2004

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Heinle

2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Laufer

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Regulation des Vasotonus	1
1.1.1	Aufbau der Arterienwand	1
1.1.2	Kontraktionsmechanismus der glatten Muskulatur	2
1.1.3	Regulation durch Endothel-glattnuskuläre Wechselwirkung	3
1.1.3.1	Vasorelaxation durch das Endothel	3
1.1.3.2	Vasokonstriktion durch das Endothel	7
1.1.4	Regulation durch Hormone	7
1.1.5	Weitere gefäßaktive Substanzen	8
1.2	Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies	9
1.3	Antioxidative Schutzmechanismen	12
1.3.1	Enzymatische Reaktionen	12
1.3.2	Nichtenzymatische Antioxidantien	13
1.3.2.1	Endogene Antioxidantien	14
1.3.2.2	Antioxidantien pflanzlicher Herkunft	14
1.3.2.3	Weitere postulierte Antioxidantien	14
1.4	Pathophysiologische Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies für vaskuläre Erkrankungen	15
1.4.1	Arterielle Hypertonie	16
1.4.2	Diabetes mellitus	16
1.5	Fragestellungen	18
2	MATERIAL	19
2.1	Geräte	19
2.2	Chemikalien und Reagenzien	19
2.3	Lösungen	21
2.3.1	Physiologische Salzlösungen	21

2.3.2	Lösungen zur Stimulation von Kontraktionen	21
2.3.3	Lösungen zur Untersuchung der Endothelfunktion	22
2.3.4	Lösungen zur Induktion von oxidativem Stress	22
2.3.5	Lösungen zur Messung der Chemilumineszenz	23
2.3.6	Arzneistofflösungen	24
2.3.7	Sonstige Lösungen	24
3	METHODEN	25
3.1	Biologisches Material	25
3.1.1	Rattenaorta	27
3.1.2	Arteria carotis von Kaninchen	28
3.1.3	Schweinehirngefäße	28
3.1.4	Humane Arteria mammaria	28
3.1.5	Humane Plazentaarterien und -venen	28
3.2	Messmethoden	29
3.2.1	Messanordnung zur Gefäßmechanik	29
3.2.2	Kontraktion der Blutgefäße und deren endotheliale Relaxation	30
3.2.3	Einfluss von oxidativem Stress auf die Gefäßkontraktion	32
3.2.4	Einfluss von oxidativem Stress auf die Endothel-vermittelte Vasorelaxation	33
3.2.5	Einfluss von ACE-Hemmern und AT ₁ -Antagonisten auf die Endothelfunktion	34
3.2.6	Radikalproduktion von Gefäßpräparaten	35
3.3	Statistik	37

4	ERGEBNISSE	38
4.1	Einfluss von Hydroperoxiden auf die vaskuläre Radikalfreisetzung	38
4.1.1	Untersuchungen an Rattenaorta	39
4.1.2	Untersuchungen an humaner Arteria mammaria	40
4.1.3	Zusammenfassung des Einflusses von Hydroperoxiden auf die vaskuläre Radikalfreisetzung	41
4.2	Einfluss von oxidativem Stress auf die KCl- bzw. Serotonin-induzierte Kontraktion	42
4.2.1	Peroxideffekt auf die KCl-induzierte Kontraktion von Rattenaorten	43
4.2.2	Peroxideffekt auf die KCl-induzierte Kontraktion von Kaninchencarotiden	46
4.2.3	Peroxideffekt auf die KCl-induzierte Kontraktion von humanen Plazentagefäßen	47
4.2.4	Peroxideffekt auf die Serotonin-induzierte Kontraktion von Arteria cerebri media-Gefäßen vom Schwein	48
4.2.5	Zusammenfassung des Einflusses von oxidativem Stress auf die KCl- bzw. Serotonin-induzierte Kontraktion	50
4.3	Einfluss von oxidativem Stress auf die Endothel-vermittelte Vasorelaxation	51
4.3.1	Versuchsablauf zur Ermittlung des Einflusses von oxidativem Stress auf die Endothel-vermittelte Vasorelaxation von Rattenaorten und Kaninchencarotiden	51
4.3.2	Untersuchungen an Rattenaorten	53
4.3.2.1	Einfluss von Wasserstoffperoxid	53
4.3.2.2	Einfluss von <i>tert.</i> -Butylhydroperoxid	54
4.3.2.3	Einfluss von Kaliumsuperoxid	56
4.3.2.4	Einfluss von Xanthin/XOD	59
4.3.3	Untersuchungen an Kaninchencarotiden	62
4.3.3.1	Einfluss von Wasserstoffperoxid	62
4.3.3.2	Einfluss von <i>tert.</i> -Butylhydroperoxid	63

4.3.4	Untersuchungen an Arteria cerebri media vom Schwein	64
4.3.4.1	Versuchsablauf	64
4.3.4.2	Einfluss von Wasserstoffperoxid und <i>tert.</i> -BHP	66
4.3.5	Zusammenfassung der Wirkung von oxidativem Stress auf die Endothel-vermittelte Vasorelaxation	67
4.4	Untersuchungen an Aorten aus hypertensiven und diabetischen Ratten	67
4.4.1	Untersuchungen an Aorta aus hypertensiven Ratten	68
4.4.1.1	Einfluss des ACE-Hemmers Captopril	68
4.4.1.2	Einfluss des AT ₁ -Antagonisten Candesartan	70
4.4.1.3	Einfluss des AT ₁ -Antagonisten Losartan	71
4.4.2	Untersuchungen mit Aorta aus diabetischen Ratten	73
5	DISKUSSION	75
5.1	Einfluss von Hydroperoxiden auf die vaskuläre Radikalfreisetzung	75
5.1.1	Einfluss von Hydroperoxiden auf die Radikalbildung	75
5.1.2	Einfluss von Hydroperoxiden auf den Vasotonus	79
5.1.2.1	Einfluss von Hydroperoxiden auf die glatte Muskulatur	79
5.1.2.2	Einfluss von Hydroperoxiden auf die intrazelluläre Ca ²⁺ -Homöostase in glatten Muskelzellen	83
5.1.2.3	Eigene Befunde	85
5.1.3	Einfluss auf die Endothelfunktion	86
5.1.3.1	Einfluss von Hydroperoxiden auf den intrazellulären Ca ²⁺ -Spiegel in Endothelzellen	87
5.1.2.2	Einfluss von Hydroperoxiden auf die endotheliale NO-Synthase	89
5.1.2.3	Eigene Befunde	91
5.1.4	Langfristiger Einfluss von oxidativem Stress auf Blutgefäße	93

5.2	Endotheliale Dysfunktion bei arterieller Hypertonie und Diabetes	95
5.2.1	Arterielle Hypertonie	95
5.2.1.1	Einfluss von ACE-Hemmern und AT ₁ -Antagonisten auf die Endothelfunktion	98
5.2.2	Diabetes mellitus	101
5.2.2.1	Einfluss von Diabetes mellitus auf die Endothelfunktion	101
6	ZUSAMMENFASSUNG	103
7	LITERATURVERZEICHNIS	107
8	ANHANG	118
8.1	Abkürzungen	118

1 Einleitung

1.1 Regulation des Vasotonus

Die glatte Muskulatur der Blutgefäße ist für die Regulation des Blutkreislaufs von entscheidender Bedeutung. Dieser Muskeltyp ist vor allem auf die Aufrechterhaltung von Dauerspannungen und auf langsame Spannungsänderungen spezialisiert. Bereits unter Ruhebedingungen befinden sich die Blutgefäße in gedehntem Zustand, der als Ruhetonus bezeichnet wird. Eine Abnahme dieses Tonus führt zu einer Vasodilatation, eine Zunahme zur Vasokonstriktion. Die Muskulatur der großen Arterien hat also die Aufgabe, den arteriellen Druck aufrechtzuerhalten, so dass ein den Anforderungen der distalen Organe entsprechender Blutfluss ermöglicht wird.

1.1.1 Aufbau der Arterienwand

Die Wand der Arterien besteht aus drei Schichten, der Tunica interna (Intima), der Tunica media (Media) und der Tunica externa (Adventitia). Die Intima kleidet die Innenwand der Gefäße aus und besteht aus einer Schicht von Endothelzellen, die einer von feinen kollagenen und elastischen Fasern gebildeten gefensterten Membran, der *Elastica interna*, aufsitzt. Die angrenzende Media besteht aus schichtweise spiralförmig oder zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen, zwischen denen wiederum kollagene bzw. elastische Fasern liegen. Die Adventitia bildet die äußerste Schicht der Gefäßwand und verbindet diese mit der Umgebung. Sie besteht aus längs verlaufenden Bindegewebsfasern, in die auch glatte Muskelzellen eingebettet sind. In dieser Gefäßwandschicht befinden sich außerdem Nerven und ernährende Blutgefäße. Die großen herznahen Arterien (z. B. Aorta oder Arteria carotis) sind durch eine

dicke Intima und durch dichte elastische Netze innerhalb der Media charakterisiert. Aufgrund ihrer großen Dehnbarkeit werden sie als Arterien vom elastischen Typ bezeichnet. Da die Zahl der glatten Muskelfasern in der Media mit wachsender Distanz zum Herzen zunimmt, verlieren die Arterien ihre Dehnbarkeit und werden daher Arterien vom muskulären Typ genannt.

1.1.2 Kontraktionsmechanismus der glatten Muskulatur

Die glatte Muskulatur ist aus Schichten spindelförmiger Zellen aufgebaut. Als kontraktile Elemente enthalten die Zellen glattmuskuläre F-Aktin-Tropomyosin- und Myosin-II-filamente. Die Filamente formen einen losen Kontraktionsapparat, der ungefähr in Längsrichtung der Zelle angeordnet und an scheibenförmigen Anheftungsplaques an der Zellmembran befestigt ist. Kontraktionen werden durch Filamentgleiten des Aktin und Myosin vermittelt. Diese beiden Moleküle sind jeweils so angeordnet, dass sie unter ATP-Verbrauch teleskopartig ineinander gleiten können. Im Allgemeinen wird die glattmuskuläre Kontraktion dadurch ausgelöst, dass die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration auf $>10^{-6}$ mol/l ansteigt. Da in der glatten Muskelzelle das sarkoplasmatische Retikulum schwach ausgebildet ist, sind neben der Bereitstellung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern auch Ca^{2+} -Ströme aus dem Extrazellularraum von Bedeutung. Das Ca^{2+} bindet sich an Calmodulin und der entstehende Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex aktiviert die Myosinleichtkettenkinase (MLCK). Diese Kinase phosphoryliert die regulatorische leichte Kette des Myosins und ermöglicht dadurch die Interaktion zwischen dem Myosinkopf und Aktin. Am Aktin-Tropomyosin-Komplex führt Ca^{2+} -Calmodulin durch Bindung an Caldesmon zur Freigabe des Aktin. Die Lösung des Aktin-Tropomyosin-Komplexes kann außerdem durch Phosphorylierung von Caldesmon durch Proteinkinase C erfolgen. Der Tonus der glatten Muskulatur nimmt ab, wenn der

intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel auf $<10^{-6}$ mol/l absinkt, die Konzentration von cGMP (cyclisches Guanosylmonophosphat) ansteigt (siehe 1.1.3.1), eine andere Stelle der regulatorischen Kette des Myosins durch die Proteinkinase C phosphoryliert oder die Myosinphosphatase aktiviert wird.

Der vaskuläre Muskeltonus wird auf verschiedene Art und Weise beeinflusst, z.B. von den Endothelzellen der Blutgefäße, dem Hormonsystem oder dem Nervensystem. Da der Einfluss der ersten beiden Faktoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, werden diese im Folgenden genauer erläutert.

1.1.3 Regulation durch Endothel-glattmuskuläre Wechselwirkung

Aus den Endothelzellen der Intima werden verschiedene Moleküle freigesetzt, die zu Vasokonstriktion oder -dilatation führen können. Normalerweise überwiegt der relaxierende Effekt gegenüber dem Einfluss der Vasokonstriktoren (Arnal et al. 1999). Im Folgenden werden zunächst die relaxationsauslösenden und dann die kontraktionsverstärkenden Mechanismen dargestellt.

1.1.3.1 Vasorelaxation durch das Endothel

1980 entdeckten Furchgott und Zawadzki, dass die durch Acetylcholin (ACh) ausgelöste Relaxation kontrahierter Gefäßmuskulatur abhängig von der Endothelzellschicht ist. Der für die Relaxation verantwortliche Faktor wurde damals EDRF (endothelium derived relaxing factor) genannt und entpuppte sich

später als das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) (vgl. Ignarro 1989). Für die Biosynthese von NO benötigt das Enzym NO-Synthase (NOS) L-Arginin als Substrat. Unter Beteiligung von molekularem Sauerstoff sowie NADPH als Reduktant entsteht bei diesem Redoxprozess das instabile Zwischenprodukt N^o-hydroxy-L-Arginin, das weiter zu Citrullin und NO umgesetzt wird (Schmidt et al. 1996). Die Endprodukte dieser Reaktion sind folglich NADP⁺, L-Citrullin und NO (siehe Abb. 6).

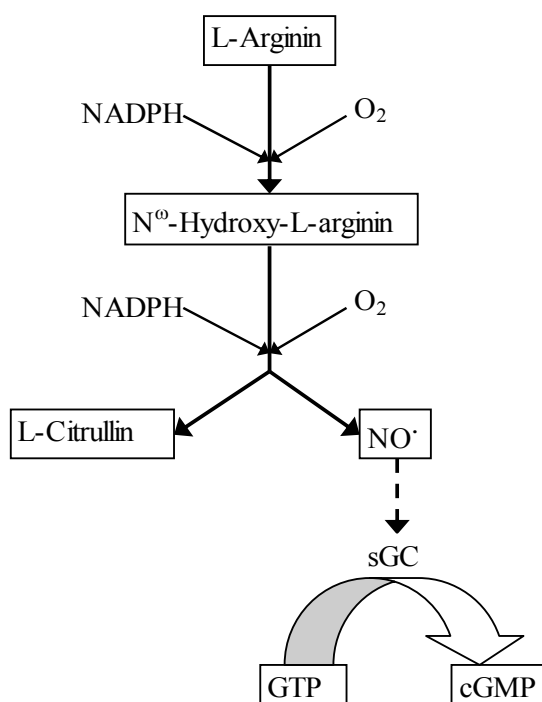


Abb. 1: Reaktionsweg zur enzymatischen Herstellung von NO aus L-Arginin durch die NO-Synthase sowie dessen Reaktion mit dem Zielmolekül sGC (lösliche Guanylatcyclase) zur Bildung von cGMP aus GTP. Zitiert nach Pagliaro (2003).

Die drei wichtigsten Isoformen der NO-Synthase sind die endotheliale NOS (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) sowie die induzierbare NOS (iNOS) (Alderton et al. 2001). Die Aktivitäten dieser drei Isoformen sind sehr unterschiedlich: die eNOS sowie die nNOS sind calciumabhängig und in vielen

Gewebe konstitutiv vorhanden, während die iNOS unabhängig von Ca^{2+} ist und in verschiedenen Geweben durch Substanzen wie inflammatorische Zytokine oder durch Ischämie induziert wird. Die konstitutiv vorhandenen Enzymformen eNOS und nNOS werden über einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert und setzen selbst unter Stimulation mit pharmakologischen Substanzen (z.B. Acetylcholin oder Bradykinin) NO nur in nanomolaren Mengen frei. Die iNOS unterliegt dagegen keinem negativen Feedback-Mechanismus durch NO und produziert dieses in mikromolarer Konzentration (Wink und Feelisch 1996, Kojda und Kottenberg 1999). Die meisten physiologischen Reaktionen des NO werden durch dessen Wechselwirkung mit Fe^{2+} in prosthetischen Hämgruppen von Proteinen vermittelt; so werden viele kardiovaskuläre Effekte in Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Thrombozyten beispielsweise durch die NO-Bindung an das Fe^{2+} -Häm der löslichen Guanylatcyclase eingeleitet (Balligand et al. 2000).

Auf den vaskulären Muskeltonus können sowohl die eNOS der Endothelzellen als auch die iNOS in Leukozyten und glatten Muskelzellen Einfluss nehmen. Da unter physiologischen Bedingungen die eNOS die wesentlichere Rolle spielt, soll hier die Bedeutung dieser Isoform betrachtet werden. Die Hemmung des Enzyms z.B. mit Nitro-arginin-methylester (NAME) ruft in vivo eine Blutdrucksteigerung hervor, so dass man von einer basalen NO-Freisetzung ausgehen kann (Heinle 1999). Andererseits kann die Aktivität der eNOS über entsprechende Rezeptoren durch verschiedene pharmakologisch wirksame Substanzen stimuliert werden, z.B. durch Serotonin, Thrombin, Bradykinin, Acetylcholin oder Endothelin 1. Für Serotonin, Acetylcholin und Endothelin befinden sich auch auf der glatten Muskulatur Rezeptoren, wobei diese hier paradoxerweise eine kontraktionsauslösende Wirkung haben. Normalerweise überwiegt der relaxierende Effekt dieser Stoffe, doch kann in Gefäßabschnitten, bei denen das Endothel defekt ist, die kontrahierende Wirkung in den

Vordergrund treten. Dies kann z.B. bei atherosklerotischen Segmenten der Fall sein. Die durch den Blutfluss am Endothel induzierten Scherkräfte stellen einen weiteren Stimulus der eNOS dar (Tiritilli 1998). Unter physiologischen Bedingungen wird NO im Konzentrationsbereich [0,1-100 nM] freigesetzt.

In den glatten Muskelzellen der Gefäßwand ist die lösliche Guanylatcyclase (sGC) wichtigstes Zielmolekül des NO (Hofmann et al. 2000). Dieses Enzym ist ein Heterodimer und besteht aus einer α - sowie einer β -Untereinheit und enthält Häm als prosthetische Gruppe (Gerzer et al. 1981). Von den drei Redoxformen des Stickstoffmonoxids (NO^- , NO^\cdot , NO^+) stimuliert lediglich die ungeladene Form (NO^\cdot) die sGC signifikant (Dierks und Burstyn 1996), wobei die Aktivität des Enzyms um das 200fache ansteigt (Stone und Marletta 1994). Nach Stimulation des Enzyms durch NO setzt dieses unter Beteiligung des Cofactors Mg^{2+} GTP zu cGMP um (siehe *Abb. 1*), welches wiederum als Second Messenger mit intrazellulären Rezeptorproteinen interagiert. Der wichtigste Rezeptor für cGMP in glatten Muskelzellen ist die cGMP-abhängige Serin/Threonin-Proteinkinase. Diese Kinase katalysiert die Phosphorylierung zahlreicher Proteine, die unter anderem an der Regulation der Aktivität kontraktiler Filamente in glatten Muskelzellen beteiligt sind, und hemmt somit die Aktin-Myosin-Wechselwirkung. Dies führt zusammen mit einer Absenkung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und einer Desensibilisierung der Muskelzellen für Ca^{2+} zu einer Relaxation der glatten Muskulatur (Lincoln et al. 2001).

Ein weiterer Mediator, der in den Endothelzellen gebildet wird und vor allem bei Entzündungsreaktionen Vasodilatation herbeiführt, ist Prostazyklin, welches hier aber nicht weiter beschrieben werden soll.

1.1.3.2 Vasokonstriktion durch das Endothel

Vom Endothel kommen andererseits Substanzen, die den Tonus der glatten Muskulatur erhöhen, also eine Vasokonstriktion bewirken. Hierbei spielen Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) sowie Endotheline eine wesentliche Rolle. Durch die Reaktion von Superoxidanionen mit NO unter Bildung von Peroxynitrit kann der Vasotonus durch oxidativen Stress in besonderem Maße gesteuert werden. Die Wechselwirkungen zwischen Radikalen und Blutgefäßen bzw. Endothelzellen werden im Verlauf der vorliegenden Arbeit genauer untersucht und unter **1.2** beschrieben.

1.1.4 Regulation durch Hormone

An der Modulation des arteriellen Muskeltonus sind zahlreiche Hormone beteiligt. Da in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen an einem Hypertonie-modell vorgenommen wurden, soll die Bedeutung von AT II näher beschrieben werden.

Angiotensin II (AT II) ist ein starker Vasokonstriktor und wird von dem Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) aus dem Decapeptid Angiotensin I durch Abspaltung zweier Aminosäuren gebildet. Die Freisetzung von AT II findet nicht nur in der Niere sondern auch lokal in Endothelzellen der Gefäßwand selbst statt (Caputo et al. 1995). AT II stellt ein Agonist des AT_1 -Rezeptors dar und bindet auch mit hoher Affinität am AT_2 -Rezeptor. Durch Northern Blot und RT-PCR-Analyse konnte die mRNA dieser beiden Rezeptorsubtypen in Blutgefäßen und zahlreichen anderen Geweben nachgewiesen werden, wo sie unterschiedliche Signale vermitteln. In den Blutgefäßen werden AT II-Reaktionen vor allem über den Rezeptorsubtyp 1

vermittelt (Thomas und Mendelsohn 2003). Sowohl der AT₁- als auch der AT₂-Rezeptor sind in die Zellmembran eingelagert und weisen 7 Transmembranspannen auf. Nach Agonistenbindung werden weitere Signale über G-Proteine ins Zellinnere weitergeleitet. Kontraktionen werden durch die AT II-Bindung an den AT₁-Rezeptor vermittelt, indem eine Phospholipase C-1 β -abhängige Aktivierung der Proteinkinase C sowie eine intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung stattfinden. Darüber hinaus werden Signalwege in Gang gesetzt, die mit der Aktivierung der NADPH-Oxidase sowie von Wachstums- und Zytokinrezeptoren verbunden sind (Campbell 2003). Auf die Bindung von AT II an den AT₁-Rezeptor folgt dessen endocytotische Aufnahme in Vesikeln ins Zellinnere, was bei AT₂-Rezeptoren nicht der Fall ist (Thomas und Mendelsohn 2003).

Zur Therapie vor allem hochdruckbedingter kardiovaskulärer Krankheiten werden ACE-Hemmer (z.B. Captopril) oder AT₁-Rezeptorantagonisten (z.B. Candesartan, Losartan) eingesetzt. Während ACE-Hemmer die Bildung von Angiotensin II verhindern, unterbinden AT₁-Rezeptorantagonisten die Weiterleitung der durch AT II vermittelten Signale.

1.1.5 Weitere gefäßaktive Substanzen

An der Regulation der lokalen Durchblutung sind viele weitere Mediatoren beteiligt, dazu gehören beispielsweise Substanzen wie Serotonin aus Thrombozyten, Histamin aus Mast- oder Blutzellen, das Gewebshormon VIP (Vascular-Intestinal-Peptid) oder der Wachstumsfaktor PDGF.

Die bisher beschriebenen Mediatoren sind für die physiologischen Regulationsprozesse im Körper von wesentlicher Bedeutung. Bei verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. Bluthochdruck, Diabetes mellitus oder Atherosklerose, kommt es jedoch zu langfristigen Störungen dieser physiologischen Prozesse. Da hierbei das vermehrte Auftreten von Radikalen bzw. reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine wesentliche Rolle spielen soll, werden im nächsten Abschnitt die Entstehung sowie Beseitigung dieser Stoffe unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen im Körper dargestellt.

1.2 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies

Die im Stoffwechsel gebildeten reaktiven Metabolite werden in zwei Gruppen unterschieden: die Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die der freien Stickstoffradikale. Zu den ROS werden einerseits Sauerstoffradikale wie das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) oder das sehr reaktionsfähige Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) gezählt, andererseits gehören zu dieser Substanzgruppe auch Nichtradikale wie das relativ stabile Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hypochlorsäure ($HOCl$), die aufgrund ihrer oxidierenden Wirkung eine Radikalbildung begünstigen. Zur Gruppe der Stickstoffradikale gehört das Stickoxid (NO). Aus der Reaktion von $O_2^{\cdot-}$ mit NO^{\cdot} entsteht das Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$), das aber schnell zu $OH^{\cdot} + NO_2^{\cdot}$ zerfällt.

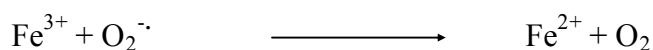
Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden unter physiologischen Bedingungen im Rahmen des oxidativen Metabolismus intrazellulär und extrazellulär an verschiedenen Entstehungsorten im menschlichen Körper freigesetzt. In den Mitochondrien werden quantitativ am meisten Radikale gebildet, da hier ca. 95% des eingeatmeten Sauerstoffs umgesetzt werden. Neben dem Hauptreaktionsprodukt Wasser (H_2O) fallen auch geringe Mengen von $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2

an (Siems et al. 1998). Zusammen mit der Superoxidbildung im endoplasmatischen Retikulum liegt die insgesamt freigesetzte $O_2^{\cdot-}$ -Menge der mitochondrialen Atmungskette bei ca. 2% des aufgenommenen Sauerstoffs (Gutteridge et al. 1985). Die folgende Aufzählung stellt die quantitativ bedeutendsten Quellen für die Bildung reaktiver Spezies im Körper dar (Siems et al. 1998):

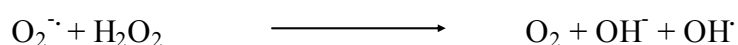
- Mitochondriale Atmungskette
- Purinabbau (Xanthinoxidase)
- Catecholaminoxidation
- Autooxidation von reduzierenden Verbindungen wie Oxy-Hämoglobin oder Thiolen
- Xenobiotika-Entgiftung (Reaktionen des Cytochrom-P450-Systems)
- Neutrophile Granulozyten und Makrophagen (NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase)
- Arachidonsäuremetabolismus (Cyclooxygenase)
- UV-Strahlung sowie radioaktive Strahlung

Wichtige Folgereaktionen mit freien Radikalen sind in nachstehenden Gleichungen beschrieben.

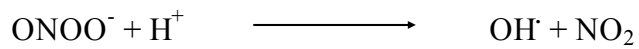
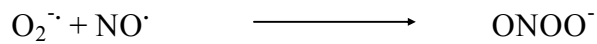
1. Haber-Weiss-Reaktion



Gesamtreaktion:

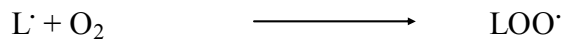
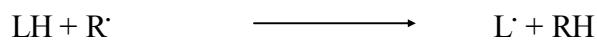


2. Peroxynitritbildung

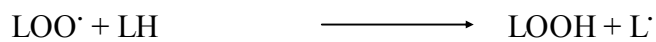


3. Reaktion von freien Radikalen mit Fettsäuren

- a) Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren (LH) der Zellmembran und Bildung eines Fettsäureperoxidradikals (LOO^{\cdot})



- b) Einleitung einer Kettenreaktion durch Reaktion von LOO^{\cdot} mit der Seitenkette einer benachbarten Fettsäure (LH) unter Bildung von Lipidperoxid (LOOH).



1.3 Antioxidative Schutzmechanismen

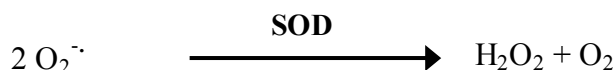
Um sich vor Schädigung durch freie Radikale zu schützen, unterhält der Organismus Systeme, die die Konzentration der ROS niedrig halten. Diese Schutzsysteme bestehen aus enzymatischen Abfangreaktionen und nicht-enzymatischen Antioxidantien.

1.3.1 Enzymatische Reaktionen

Unter engem Zusammenwirken bilden die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase eine enzymatische Barriere und wandeln Radikale in unschädliche Moleküle um. Für eine optimale Enzymaktivität sind sie auf das Vorhandensein ausreichender Mengen an Kupfer, Zink und Selen angewiesen, da ihre aktiven Zentren metallorganische Verbindungen darstellen. Die einzelnen Reaktionen, die durch das jeweilige Enzym katalysiert werden, sind (Plecko et al. 1998):

a) Superoxiddismutase

Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Umsetzung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Es gibt zwei Isoformen dieses Enzyms: die Mangan-abhängige Mn-SOD in Mitochondrien sowie die Kupfer- und Zink-haltige Cu_2Zn_2 -SOD.

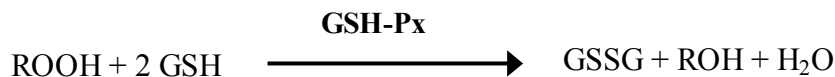


b) Katalase

Die Katalase ist ein Eisen-Porphyrin-haltiges Enzym, welches die Disproportionierung von H_2O_2 zu Sauerstoff und Wasser katalysiert.

**c) Glutathion-Peroxidase**

Die Selen-haltige Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) katalysiert die Reduktion organischer Hydroperoxide und H_2O_2 , wobei reduziertes Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird. Die vier verschiedenen Isoformen dieses Enzyms sind nach ihrem Wirkort benannt, man unterscheidet daher die cytosolische cGSH-Px, die im Plasma vorkommende pGSH-Px, die im Gastrointestinaltrakt lokalisierte GSH-Px-GI sowie die membrangebundene Phospholipidhydroperoxid-Glutathion-Peroxidase PH-GSH-Px.

**1.3.2 Nichtenzymatische Antioxidantien**

Diese Stoffgruppe umfasst einerseits die endogenen Antioxidantien, die im Organismus synthetisiert werden, sowie diejenigen pflanzlicher Herkunft, die dem Körper über die Nahrung zugeführt werden müssen. Nachfolgende Aufzählung gibt Auskunft über die einzelnen Stoffe dieser Gruppen (Plecko et al. 1998, Siems et al. 1998).

1.3.2.1 Endogene Antioxidantien

Der einzige hydrophobe Vertreter dieser Stoffgruppe ist das Ubiquinon, das u. a. in Mitochondrien vorkommt. Die endogenen Antioxidantien hydrophiler Art sind entweder intrazellulär oder extrazellulär wirksam. In der Zelle sind Glutathion und Metallothionein an der Beseitigung schädigender Radikale beteiligt. Extrazellulär wirksame Antioxidantien sind Harnsäure, Dihydroliponsäure sowie verschiedene Proteine, z.B. Transferrin, Coeruloplasmin und Albumin, welche Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} oder Cu^{2+} binden und so deren katalytischen Effekt bei der Radikalbildung verhindern (Markant et al. 1995).

1.3.2.2 Antioxidantien pflanzlicher Herkunft

Die wichtigsten Substanzen dieser Gruppe sind die Vitamine L-Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E) und β -Carotin (Provitamin A).

1.3.2.3 Weitere postulierte Antioxidantien

Es gibt noch eine Zahl weiterer pflanzlicher Antioxidantien, die für den Körper zwar nicht essentiell sind, ihn aber dennoch wirksam vor oxidativen Angriffen schützen können. Dazu gehören pflanzliche Phenole wie Catechine, Anthocyane, Flavone, Tannine und Cumarinderivate, sowie polyfunktionelle organische Säuren. Die antioxidative Eigenschaft ist hier auf das Vorhandensein redoxsensitiver phenolischer Gruppen zurückzuführen, die stabile Phenoxy-Radikale bilden können (Nuhn 1990).

1.4 Pathophysiologische Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies für vaskuläre Erkrankungen

Im Organismus bzw. in den Zellen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und -abbau. Findet jedoch eine vermehrte Freisetzung von ROS statt oder weisen die antioxidativen Schutzsysteme Defizite auf, treten durch die Radikale Schädigungen auf (oxidativer Stress), was als Ursache zahlreicher chronischer Krankheiten postuliert wird. Für die Entstehung der Atherosklerose spielt vor allem die oxidative Veränderung des LDL eine wesentliche Rolle. Die darauf folgende Entstehung von Intimaschäden führt zu Einbußen der Gefäßwandelastizität und der Endothelfunktion (Mügge et al. 1998, Yuan et al. 1998). Atherosklerotische Plaques entstehen und können zu arteriellen Stenosen oder Verschlüssen und somit zu tödlichen Organausfällen wie Myokardinfarkt oder Apoplex führen (vgl. Heinle 1999). Aufgrund der resultierenden Durchblutungsstörungen ist die Atherosklerose häufigste Todesursache in den Industriestaaten (ca. 50%).

Eine Reihe von Risikofaktoren begünstigt die Entstehung der Atherosklerose. Hierzu zählen unter anderem arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus, deren Pathogenese durch ein vermehrtes Auftreten von ROS sowie durch endotheliale Dysfunktion gekennzeichnet ist (vgl. Lockette et al. 1986, Durante et al. 1998), so dass auch hier möglicherweise oxidative Veränderungen der Gefäßwand eine Rolle spielen. Da im Verlauf dieser Arbeit Aorten aus entsprechenden Tiermodellen untersucht wurden, soll abschließend kurz auf diese beiden Krankheiten eingegangen werden.

1.4.1 Arterielle Hypertonie

Nur für wenige Formen der arteriellen Hypertonie ist die Pathogenese eindeutig geklärt, besonders für primäre Formen lassen sich bisher nur Risikofaktoren wie psychosozialer Stress, veränderte Hormonwirkung, hoher Kochsalzkonsum, Adipositas, genetische Disposition etc. beschreiben. Wie schon erwähnt, sind auch ein vermehrtes Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies sowie endotheliale Dysfunktion beobachtet worden, in der möglicher Weise ein kausaler Mechanismus besteht (Lockette et al. 1986).

Die Symptome der essentiellen Krankheitsform können nur medikamentös behandelt werden. Wichtige Arzneistoffe sind hier unter anderem solche Wirkstoffe, die in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System eingreifen. Dazu gehören ACE-Hemmer (z.B. Captopril), die die Bildung von AT II verhindern sowie AT₁-Rezeptorantagonisten (z.B. Losartan, Candesartan), die dessen Wirkung an den AT₁-Rezeptoren unterbinden. Inwiefern die einzelnen Medikamente dabei Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion haben, sollte durch weiterführende Versuche an Aorten aus hypertensiven Ratten untersucht werden.

1.4.2 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist die häufigste und zugleich bedeutsamste Stoffwechselstörung, in Deutschland sind davon 5-6% der Bevölkerung betroffen. Von besonderer Bedeutung ist hier der Typ-II-Diabetes, dessen Vorstufe durch das so genannte „metabolische Syndrom“ gekennzeichnet ist und dessen charakteristische Merkmale Hyperinsulinämie, Hypertonie, Hyperlipoproteinämie sowie Adipositas sind. Auch bei dieser Krankheit wurden

eine gesteigerte vaskuläre Radikalbildung sowie eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion festgestellt (vgl. Durante et al. 1998). Eine mögliche Ursache für das vermehrte Auftreten von oxidativem Stress bei Typ-II-Diabetes liegt in der Reaktion von Glucose mit Hämoglobin zum stabilen HbA_{1c}. Durch Folgereaktionen dieses Reaktionsproduktes mit Sauerstoff können Superoxid-anionen entstehen (Plecko et al. 1998). Die verstärkte Genese freier Radikale wiederum kann zu einer Oxidation von LDL (Low Density Lipoprotein) führen, was, wie schon erwähnt, atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand nach sich ziehen kann (Stumpe 1996). Da Aorten aus diabetischen Ratten zur Verfügung standen, sollten diese auf Veränderungen der Endothelfunktion untersucht werden.

1.5 Fragestellungen

Ausgehend von den Vorarbeiten des Physiologischen Instituts Tübingen sollten mit der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Hat durch Hydroperoxide induzierter oxidativer Stress eine einheitliche Wirkung auf die arterielle Kontraktion oder gibt es gefäßspezifische Unterschiede?
2. Lässt sich durch die akute Applikation von Hydroperoxiden eine Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen Vasorelaxation, d. h. eine endotheliale Dysfunktion induzieren?
3. Welche Rolle spielen die durch Hydroperoxide induzierten, mit Chemilumineszenz messbaren reaktiven Spezies für die Effekte auf die Gefäßfunktion?
4. Lassen sich in Rattenmodellen zur arteriellen Hypertonie bzw. zu Diabetes mellitus Schädigungen der Endothelfunktion induzieren, die durch pharmakologische Wirkstoffe therapierbar sind?

2 Material

2.1 Geräte

Biolumat LB 9500, Berthold, Wildbad

Digital pH-Meter Typ 643-1, Schott, Hofheim

Induktiver Kraftaufnehmer, Statham

Messkraftverstärker, Hottinger, Darmstadt

Metallblockthermostat DRI-Block[®] DB-3D, Techne, England

Operationsbinokular mit Beleuchtungseinheit, Zeiss, Oberkochen

Perfusionskammer mit Messeinrichtung zur Untersuchung der Gefäßwandmechanik, Physiologisches Institut, Universität Tübingen

Rollerpumpe, Desaga, Heidelberg

Stativpumpe ISM 853, Ismatec, Wertheim

Ultraschallbad Sonorex 1RK100, Bandelin Electronic, Berlin

Vortex-Genie, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Wasserbad mit Thermostat, Colora, Lorch

Zwei-Kanal-Schreiber, ABB, Metrawatt

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Acetylcholinhydrochlorid (ACh), Sigma, Deisenhofen

L-Arginin, Sigma, Deisenhofen

tert.-Butylhydroperoxid (*tert.*-BHP), Merck, Darmstadt

Calciumchlorid (CaCl₂), Merck, Darmstadt

Candesartan, Astra Zeneca, Wedel

Captopril, AWD, Dresden

Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Darmstadt

Glucose, Roth, Karlsruhe

HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure), Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid (KCl), Merck, Darmstadt

Kaliumsuperoxid (KO₂), Sigma, Deisenhofen

Losartan, Merck, Darmstadt

Lucigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridiniumdinitrat), Serva, Heidelberg

Luminol (5-Amino-1,2,3,4-tetrahydrophtalazin-1,4-dion), Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat (MgSO₄), Merck, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄×H₂O), Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Darmstadt

Nω-Nitro-L-Arginin, Sigma, Deisenhofen

Phosphorpentoxid, Merck, Darmstadt

Salzsäure (HCl) 32 % bzw. 10 M, Merck, Darmstadt

Serotonin, Serva, Heidelberg

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %, Sigma, Deisenhofen; Universitätsapotheke

Xanthin (2,6-Dihydroxypurin), Sigma, Deisenhofen

Xanthinoxidase, Sigma, Deisenhofen

2.3 Lösungen

2.3.1 Physiologische Salzlösung

Tyrode-Lösung:

NaCl	118 mM
KCl	5,3 mM
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	1,5 mM
MgSO ₄ ×7 H ₂ O	1,2 mM
CaCl ₂ ×2 H ₂ O	1,2 mM
HEPES	10 mM
Glucose	5 mM

mit NaOH 10 M auf pH 7,4 eingestellt

2.3.2 Lösungen zur Stimulation von Kontraktionen

KCl-angereicherte Tyrode-Lösung:

NaCl	93 mM
KCl	30 mM
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	1,5 mM
MgSO ₄ ×7 H ₂ O	1,2 mM
CaCl ₂ ×2 H ₂ O	1,2 mM
HEPES	10 mM
Glucose	5 mM

mit NaOH 10 M auf pH 7,4 eingestellt

Serotonin-Lösung:

Tyrode-Lösung mit Zusatz von Serotonin [10 μ M]

→ Verwendung einer 10 mM-Stammlösung

2.3.3 Lösungen zur Untersuchung der Endothelfunktion

ACh-Lösung:

Tyrode bzw. KCl-angereicherte Tyrode-Lösung mit Zusatz von ACh [0,1 μ M], [1 μ M], [5 μ M].

→ Verwendung einer 1 mM ACh-Stammlösung

N ω -Nitro-L-Arginin-Lösung:

Tyrode bzw. KCl-angereicherte Tyrode-Lösung mit Zusatz von N ω -Nitro-L-Arginin [50 μ M].

→ Verwendung einer 25 mM N ω -Nitro-L-Arginin-Stammsuspension

2.3.4 Lösungen zur Induktion von oxidativem Stress

H₂O₂-Lösung:

Tyrode bzw. KCl-angereicherte Tyrode-Lösung mit Zusatz von H₂O₂ [0,03 mM], [0,05 mM], [0,1 mM], [0,125 mM], [0,25 mM], [0,5 mM], [1 mM] oder [2 mM].

→ Verwendung von 0,01 M-, 0,1 M- und 1M H₂O₂-Stammlösungen.

tert.-BHP-Lösung:

Tyrode bzw. KCl-angereicherte Tyrode-Lösung mit Zusatz von *tert.*-BHP [0,05 mM], [0,125 mM], [0,25 mM], [0,5 mM], [1 mM] oder [2 mM].

→ Verwendung von 0,01 M-, 0,1 M- und 1M *tert.*-BHP-Stammlösungen.

KO₂-Lösung:

Tyrode bzw. KCl-angereicherte Tyrode-Lösung mit Zusatz von KO₂ [0,5 mM], [1 mM], [2 mM] oder [5 mM].

→ Verwendung einer direkt vor Applikation hergestellten 100 mM KO₂-Stammlösung

Xanthinlösung:

Es wurde eine Xanthinlösung [0,2 M] in 1 M NaOH hergestellt und mit KCl-angereicherter Tyrode-Lösung 1:10 verdünnt. Diese Stammlösung wurde dem Inkubationsmedium zugegeben, so dass die Xanthinkonzentration [80 µM] betrug.

XOD:

Die Xanthinoxidase wurde in einer Endkonzentration von [12,5 mU/ml] aus einer 40 U/4,2 ml XOD-Stammlösung hergestellt.

2.3.5 Lösungen zur Messung der Chemilumineszenz

Lucigenin-Lösung:

5 mg/ml Lucigenin DMSO entsprechend einer Endkonzentration von 110 µM.

Luminol-Lösung:

2 mg/ ml DMSO entsprechend einer Endkonzentration von 110 µM.

2.3.6 Arzneistofflösungen

Candesartan:

Tyrode-Lösung mit Zusatz von Candesartan [10 μ M]

→ Verwendung einer 5 mM Stammlösung von Candesartan in Ethanol

Captopril:

Tyrode-Lösung mit Zusatz von Captopril [10 μ M]

→ Verwendung einer 10 mM Captopril-Stammlösung

Losartan:

Tyrode-Lösung mit Zusatz von Losartan [10 μ M]

→ Verwendung einer 10 mM Stammlösung von Losartan in Ethanol

2.3.7 Sonstige Lösungen

Arginin-Lösung:

Tyrode-Lösung mit Zusatz von Arginin [100 μ M]

→ Verwendung einer 25 mM Arginin-Stammlösung

3 Methoden

3.1 Biologisches Material

Das jeweilige Gefäßmaterial wurde unter dem Operationsmikroskop mit mikrochirurgischem Besteck von Blut, Fettgewebe und Adventitia freipräpariert und mit Hilfe der Schieblehre in 4 mm lange Gefäßringe geteilt.

3.1.1 Rattenaorta

Standardratten:

Sprague-Dawley-Ratten wurden den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend in Räumen des Pharmakologischen Instituts der Universität Tübingen gehalten. Sie erhielten nach Belieben Futter (Standardratten-Futter 1324; Altromin, Lage) und Trinkwasser. Im Alter von 6-8 Wochen wurden die Tiere nach zervikaler Dislokation dekapitiert und entblutet. Die entnommene Aorta thoracalis wurde für Bestimmungen der Gefäßkontraktilität, Endothelfunktion und Radikalproduktion verwendet.

Hypertensive Ratten:

Die Haltung der Tiere (Sprague Dawley-Ratten) erfolgte in den Räumen des Pharmakologischen Institutes der Universität Tübingen. Sie erhielten Futter und Wasser ad libitum. Die Induktion des Bluthochdrucks durch Verabreichung einer kochsalzreduzierten Diät ist methodisch im Labor von Frau Priv. Doz. Dr. Albinus etabliert und wird dort routinemäßig für pharmakologische Untersuchungen verwendet. Dabei wurde den Tieren zu Versuchsbeginn 10 mg/kg KG Furosemid intraperitoneal (i.p.) injiziert. Anschließend erhielten sie 2 Wochen lang eine NaCl-reduzierte Diät (Altromin C 1036, Natrium 150,5

mg/kg, Chlorid 3,4 mg/kg). Durch den Kochsalzmangel kam es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit einer Erhöhung des Bluthochdrucks. Am Ende der zweiwöchigen kochsalzarmen Diät wurden die Tiere nach zervikaler Dislokation dekapitiert und entblutet. Die entnommene Aorta thoracalis wurde für die Bestimmung der Endothel-vermittelten Relaxation verwendet.

Diabetische Ratten:

Aus der Arbeitsgruppe von Dr. Luippold (Pharmakologisches Institut der Universität Tübingen) wurden Rattenaorten aus einer Diabetes-Mellitus-Studie zur Bestimmung der Endothelfunktion zur Verfügung gestellt. Insulin-abhängiger Diabetes mellitus (IDDM) wurde in Sprague-Dawley-Ratten durch einmalige i.p. Applikation von Streptocotozin (STZ) [60 mg/kg] induziert. Die Einstellung der Blutglucose auf 300-400 mg/dl erfolgte über einen Zeitraum von 12 Monaten durch 4wöchentliche s.c. Implantation eines Insulin-freisetzenden Systems (LinPlant; Linshin Inc. Scarborough, CDN). Die Ratten erhielten Standard-Rattenfutter (Altromin 1320) und Trinkwasser nach Belieben, zusätzlichen Gruppen wurden verschiedene Arzneistoffe verabreicht. Hierbei handelte es sich um den ACE-Inhibitor Trandolapril [0,3 mg/(kg*d)] und um den zentral wirkenden Dopamin D3 Rezeptorantagonisten BSF (BSF 201640; Firma BASF, Ludwigshafen) [10 mg/(kg*d)]. BSF wurde über das Futter, Trandolapril mit dem Trinkwasser verabreicht. Die Arzneistoffgabe erfolgte zum ersten Mal 2 Wochen nach der Behandlung mit STZ. Zur Kontrolle dienten nicht-diabetische Tiere, die mit Vehikel, d.h. H₂O, behandelt wurden. Insgesamt gab es 6 verschiedene Untersuchungsgruppen [n=5-9], darunter waren 2 nicht-diabetische Kontroll- und 4 diabetische Gruppen, bei denen die unterschiedlichen Arzneistoffe wie folgt appliziert wurden:

- 1) CON-VHC: nicht-diabetische Tiere, mit Vehikel (H₂O) behandelt
- 2) CON-BSF: nicht-diabetische Tiere, mit BSF [10 mg/(kg*d)] behandelt
- 3) DM-VHC: diabetische Tiere, mit Vehikel (H₂O) behandelt
- 4) DM-BSF: diabetische Tiere, mit BSF [10 mg/(kg*d)] behandelt
- 5) DM-ACE: diabetische Tiere, mit ACE-Hemmer [0,3 mg/(kg*d)] behandelt
- 6) DM-BSF-ACE: diabetische Tiere, mit BSF [10 mg/(kg*d)] und ACE-Hemmer [0,3 mg/(kg*d)] behandelt

3.1.2 Arteria carotis von Kaninchen

Die Kaninchen (weiße Neuseeländer) wurden in Räumen des Institutes für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität Tübingen als Kontrolltiere entsprechend genehmigter Tierversuchsvorhaben in Einzelkäfigen gehalten und erhielten Futter und Wasser ad libitum. Zur Narkose wurde ein Gemisch aus Ketanest[®]-HCl 50% (Ketamin-Base, 22 mg/kg KG, Parke-Davis, Berlin) und Rompun[®] 2% (Xylazin, 4,5 mg/kg KG, Bayer, Leverkusen) verwendet, das in die Glutealmuskulatur injiziert wurde. Nach Herzstillstand wurde die Arteria carotis communis dextra entnommen und für Untersuchungen der Endothelfunktion verwendet.

3.1.3 Schweinehirngefäße

Die Arteria cerebri media aus Schweinehirn von im Schlachthof getöteten Tieren wurde im Labor auf Eis gekühlt entnommen. Bei den so gewonnenen Präparaten wurden die Gefäßmechanik sowie die Radikalproduktion untersucht.

3.1.4 Humane Arteria mammaria

Die nach Bypass-Operationen anfallenden Reststücke der Arteria mammaria aus der CRONA-Klinik Tübingen wurden zu Bestimmungen der Kontraktilität und Radikalproduktion verwendet.

3.1.5 Humane Plazentaarterien und -venen

Aus Plazenten der Tübinger Frauenklinik von Säuglingen beiderlei Geschlechts wurden unmittelbar nach der Geburt Blutgefäße (Arterien und Venen) präpariert und deren Kontraktionsverhalten und Radikalproduktion untersucht.

3.2 Messmethoden

3.2.1 Messanordnung zur Gefäßmechanik

Die Gefäßringe wurden zwischen zwei dünnen Edelstahlstäbchen in einer auf 37°C temperierten, von physiologischer Lösung durchflossenen Kammer eingespannt (*Abb. 2*). Die Stäbchen waren einerseits mit einer Mikrometerschraube verbunden, so dass der Abstand variiert und die Präparate vorgedehnt werden konnten, andererseits an einen Kraftaufnehmer (Statham Element) gekoppelt. Kräfte, die durch Dehnung des Gefäßes oder durch isometrische Kontraktion auftraten, wurden über Kraftaufnehmer und Signalverstärker (Fa. Hottinger, Darmstadt) erfasst und durch Schreiber oder PC dokumentiert.

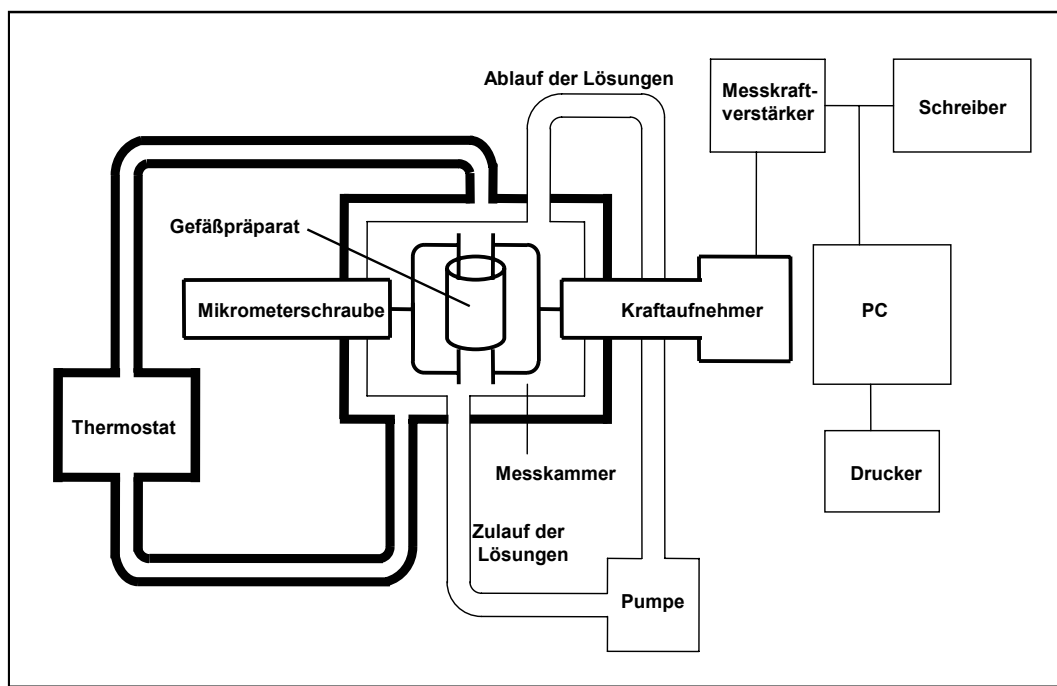


Abb. 2: Messanordnung zur in vitro-Messung der mechanischen Gefäßparameter (zitiert nach Emmerich 2003).

3.2.2 Kontraktion der Blutgefäße und deren endotheliale Relaxation

Abb. 3 zeigt die beispielhafte Aufzeichnung zur Bestimmung der Kontraktion sowie der Endothel-vermittelten Vasorelaxation in Anlehnung an die von Heinle et al. (1996) beschriebene Vorgehensweise. Der Gefäßring wurde in der von Normaltyrode durchströmten Kammer mit der Mikrometerschraube auf einen Kraftwert von 50 mN vorgedehnt, was ungefähr den Spannungsverhältnissen in vivo entspricht. Anschließend erfolgte die Applikation von Tyrode mit Zusatz von Arginin [100µM] um zu gewährleisten, dass dem Gefäßpräparat genügend Substrat für die endotheliale NO-Freisetzung zur Verfügung stand. Während der sich anschließenden Equilibrierungsphase relaxierte die Gefäßspannung auf einen basalen Wert (Basislinie). Die Stimulation einer Kontraktion erfolgte üblicherweise durch Depolarisation der glatten Muskelzellen in der Media der Gefäßrinne mit einer auf 30 mM KCl angereicherten Tyrodelösung, nur bei den Gehirngefäßen durch Zugabe des Agonisten Serotonin [10 µM]. Während der Plateauphase der Kontraktion wurde durch Applikation von steigenden ACh-Konzentrationen [0,1 µM, 1 µM und 5 µM] eine dosisabhängige Relaxation der glatten Muskulatur durch vom Endothel freigesetztes NO ausgelöst. War das Endothel geschädigt, war die kumulative Dosis-Wirkungs-Relation zwischen ACh-Konzentration und Relaxation des Gefäßes abgeflacht. Die Höhe der Kontraktionsamplitude (Plateauphase) sowie die Gesamtelaxation wurden abgemessen und prozentual dargestellt, wobei die Höhe der Kontraktionsamplitude gleich 100% gesetzt wurde (*Abb. 3*).

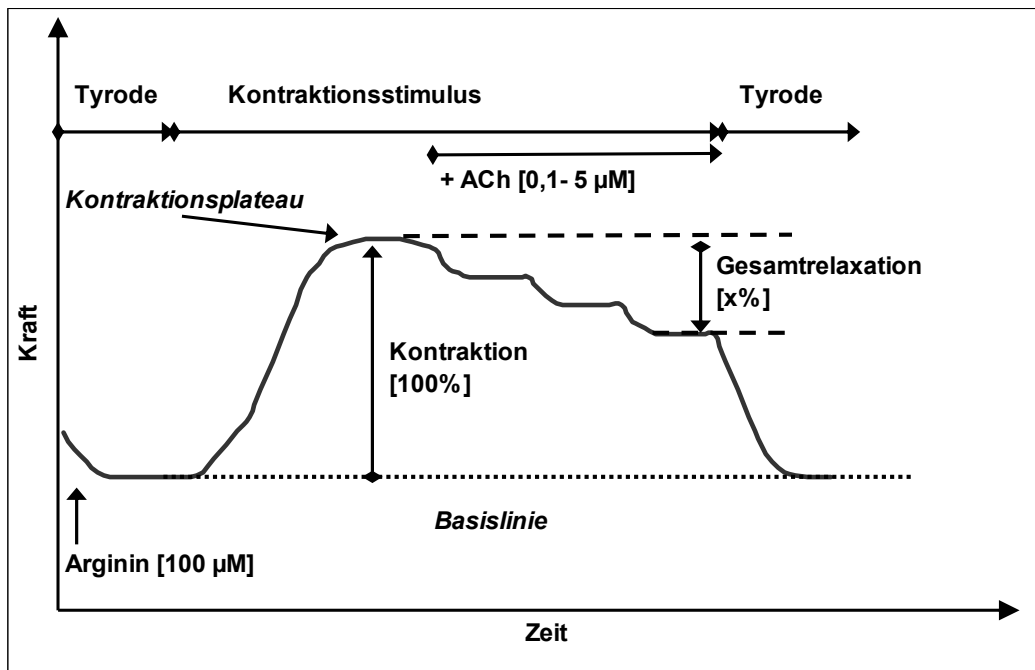


Abb. 3: Exemplarische Darstellung einer Messaufzeichnung: ACh-induzierte Relaxation nach Stimulation mit 30 mM KCl-Tyrode, kumulative Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die relative Gesamtrelaxation [x%] wurde auf die jeweils induzierte Kontraktionsamplitude [100%] bezogen.

Wurde, wie bei den Gehirnarterien, in den untersuchten Gefäßpräparaten durch den Kontraktionsstimulus gleichzeitig die endotheliale NO-Produktion aktiviert, konnte die Endothelfunktion nur durch eine Blockade der NO-Synthase mit Nitroarginin [50 µM] erfasst werden. Dieser Antagonist wurde während der Plateauphase zugesetzt, so dass eine Erhöhung der Kontraktionskraft auftrat. Die Endothelfunktion wurde hier, wie in *Abb. 4* dargestellt, als Korrelat des mit Nitroarginin ausgelösten Kraftwertes gewertet [x%] und auf die Amplitude der Kontraktionskraft bezogen [100%].

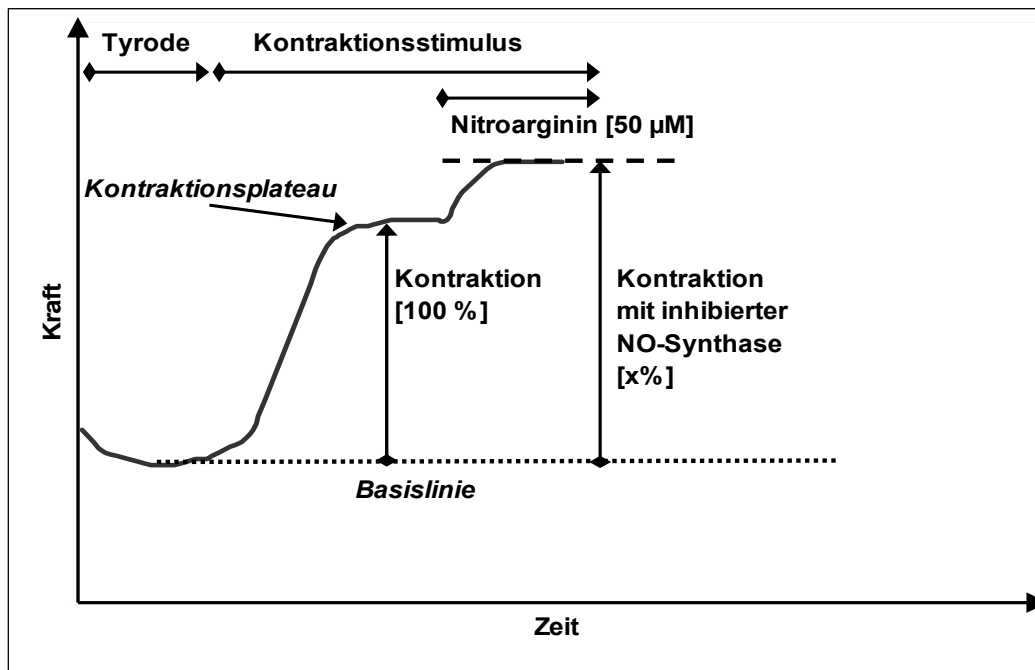


Abb. 4: Beispiel für eine Messaufzeichnung: Ermittlung der Kontraktionskrafterhöhung [x%] durch Nitroarginin [50 mM] bezogen auf die durch einen Stimulus ausgelöste Kontraktionskraft [100%].

3.2.3 Einfluss von oxidativem Stress auf die Gefäßkontraktion

Für diese Untersuchungen wurden die unter 3.1 beschriebenen Aorten aus Standardratten, Kaninchencarotiden, humanen Plazentagefäße sowie Schweinehirngefäße verwendet. Um den Einfluss von oxidativem Stress unterschiedlichen Ausmaßes auf die KCl- bzw. Agonisten-induzierte Kontraktionskraft zu ermitteln, wurden dem Perfusionsmedium am Kontraktionsplateau Peroxide verschiedener Konzentrationen zugesetzt, was im Allgemeinen zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft führte. Als Peroxide kamen H_2O_2 [0,03 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM], *tert.*-BHP [0,05 mM; 0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM] oder KO_2 [0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM] zum Einsatz. **Abb. 5** zeigt beispielhaft eine Messkurve zur Ermittlung der Peroxid-stimulierten Kontraktionskraft.

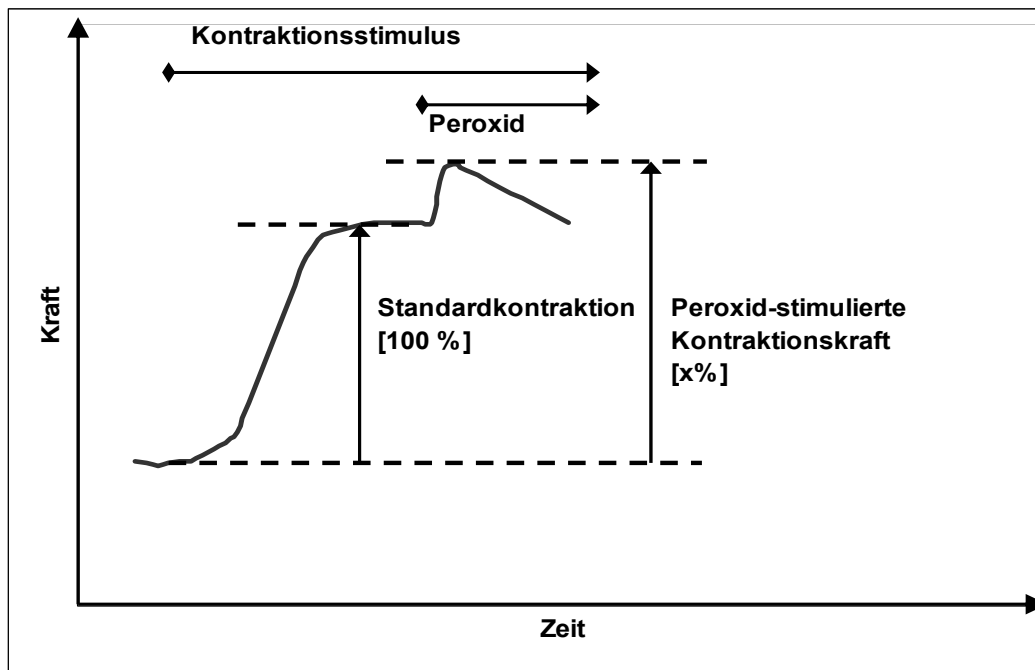


Abb. 5: Darstellung einer Messkurve zur Ermittlung des Einflusses von oxidativem Stress auf die Gefäßkontraktion als relative Peroxid-stimulierte Kontraktionskraft [x%] bezogen auf die durch den jeweiligen Kontraktionsstimulus ausgelöste Kraftentwicklung [100%] (Standardkontraktion).

Die genauen Messbedingungen für die einzelnen Gefäßspezies werden im Ergebnisteil ausführlicher beschrieben.

3.2.4 Einfluss von oxidativem Stress auf die Endothel-vermittelte Vasorelaxation

Für diese Messreihe wurden Präparate aus Rattenaorten, Kaninchencarotiden sowie Cerebralarterien vom Schwein verwendet und die Endothel-vermittelte Relaxation unter Zusatz von verschiedenen Radikal-freisetzenden Systemen gemessen. Bei Rattenaorta und Kaninchencarotis konnte die Endothelfunktion über die ACh-induzierte Relaxation, bei den Schweinhirnarterien über die Hemmung der NO-Synthase ermittelt werden. Zur Bestimmung der Wirkung

von oxidativem Stress auf die Endothelfunktion wurde diese jeweils vor und nach 10- oder 30minütiger Perfusion mit einem Radikalbildner gemessen. Als Induktoren des oxidativen Stresses wurden die Hydroperoxide H_2O_2 [0,03 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM] und *tert.*-BHP [0,05 mM; 0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM] verwendet. Des Weiteren kam das $\text{O}_2^{\cdot-}$ -bildende KO_2 [0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM] sowie Xanthin/XOD-System [8 μM /12,5 mU/ml] zum Einsatz. Da die Untersuchungen für die einzelnen Gefäßtypen unterschiedlich waren, werden die genauen Messbedingungen sowie die Parameter zur Bestimmung der Messgrößen im Ergebnisteil detaillierter beschrieben.

3.2.5 Einfluss von ACE-Hemmern und AT_1 -Antagonisten auf die Endothelfunktion

Bei dieser Versuchsreihe wurden Aortenpräparate sowohl von Standardratten als auch von Ratten mit arterieller Hypertonie auf ihr endotheliales Vasorelaxationsvermögen untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss beobachtet, den blutdrucksenkende, in die Angiotensin II-Kaskade eingreifende Arzneistoffe auf diesen Messparameter hatten. Dazu wurden der ACE-Hemmer Captopril [10 μM] sowie die AT_1 -Rezeptorantagonisten Losartan [10 μM] und Candesartan [10 μM] verwendet. Die endothelabhängige Relaxation wurde, wie in **Abb. 6** dargestellt, zunächst nach Stimulation der Gefäßpräparate mit 30 mM KCl-Tyrode mit ACh [0,1-5 μM] gemessen, anschließend wurde dieselbe unter Zusatz eines der genannten Wirkstoffe ermittelt. Ausgewertet wurde jeweils die Gesamtelaxation nach Erhöhung auf 5 μM ACh.

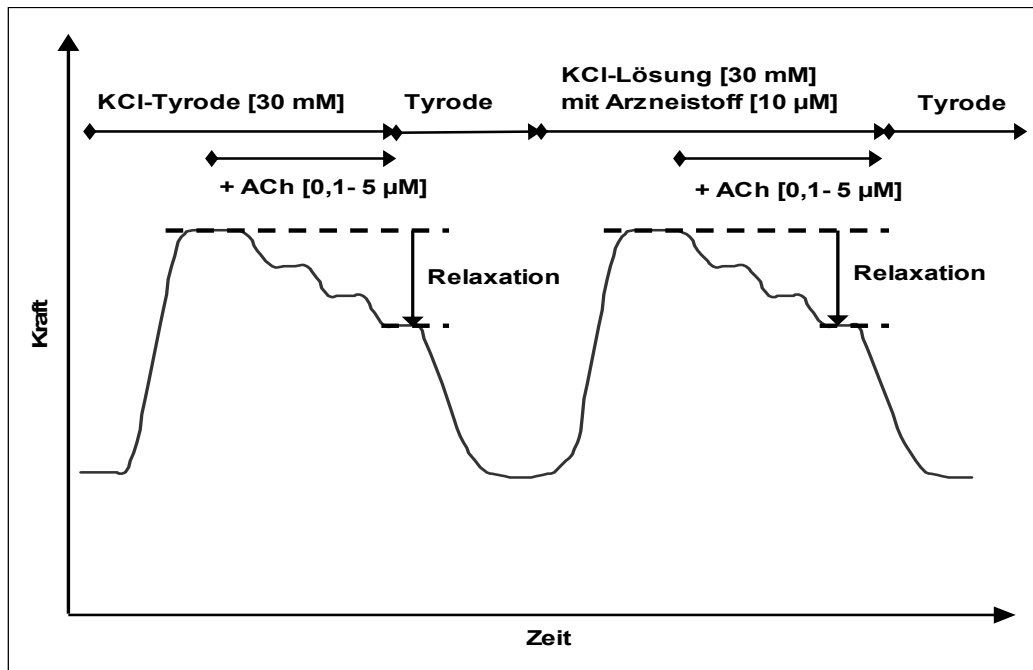


Abb. 6: Exemplarische Darstellung des Versuchsverlaufs zur Ermittlung der Endothelfunktion bei Hochdruck- und Standardratten mit und ohne blutdrucksenkendem Arzneistoffzusatz.

3.2.6 Radikalproduktion von Gefäßpräparaten

Die Messung der Radikalproduktion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Bei dieser Messmethode werden Indikatoren verwendet, die nach Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in einen elektronisch angeregten Zustand übergehen. Nach Rückfall der Elektronen in den Grundzustand emittieren diese Verbindungen Energie in Form eines Lichtsignals (Photonen) im Bereich zwischen 400-700 nm. Die erzeugten Lichtsignale können mit einem Photonenzähler (Biolumat, Berthold) gemessen und quantifiziert werden. Zur Chemilumineszenzmessung wurden die Indikatoren Luminol und Lucigenin verwendet. Luminol reagiert unspezifisch mit Radikalen unter Emission von Licht mit 460 nm Wellenlänge, während Lucigenin Licht von 519 nm aussendet und spezifisch Superoxidradikale detektiert (Lee et al. 2003). Um die Radikalsensitivität von Luminol und Lucigenin zu ermitteln, wurde die

Intensität der Chemilumineszenz mit dem Superoxidradikal-produzierenden Enzym Xanthinoxidase gemessen. Der Vergleich zeigte, dass beim Einsatz gleicher Indikatorkonzentrationen Lucigenin 1,8fach empfindlicher auf O_2^- reagierte als Luminol (vgl. Gugeler. 1997).

Als Gefäßpräparate wurden die unter **3.1** beschriebenen Rattenaorten (Standardratten), Schweinehirngefäße, humanen Plazentagefäße sowie humane Arteria mammaria verwendet. Die präparierten Segmente wurden 10 min lang bei 37°C in Tyrode vorinkubiert und danach in eine Lumineszenzküvette mit 500 µl Tyrode (37°C) überführt. Nach Zugabe von entweder Luminol- (2 mg/ml DMSO, Endkonzentration 110 µM) oder Lucigenin-Lösung (5 mg/ml DMSO, Endkonzentration 110 µM) wurde 10 min lang die Radikalproduktion ebenfalls bei 37°C im Biolumat gemessen. Als Messwert diente das Integral der Lichtsignale innerhalb von 10 min (counts per 10 min). Um die Peroxid-stimulierte Radikalproduktion zu ermitteln, wurde anschließend zu jedem Gefäßpräparat H_2O_2 oder *tert.*-BHP im Konzentrationsbereich von 0,05-1 mM zupipettiert und wiederum die Radikalproduktion 10 min lang bei 37°C gemessen (counts per 10 min). Von dem Chemilumineszenzwert vor und nach Peroxidzugabe wurde der Leerwert, d.h. die Peroxid-induzierte Radikalproduktion ohne Gewebe, subtrahiert. Der Leerwert wurde nach der oben angegebenen Vorgehensweise zu Beginn jeder Messreihe ermittelt. Nach der Messung wurden die Gefäßabschnitte im Exsikkator mit Phosphorpentoxid getrocknet und gewogen, so dass die Chemilumineszenzwerte auf das Trockengewicht bezogen werden konnten (counts per 10 min/mg Trockengewicht).

3.3 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit dem Programm WINSTAT für Excel. Zum Vergleich zweier unabhängiger Messwertreihen wurde der unabhängige t-Test, für abhängige Messwerte der t-Test für verbundene Messproben durchgeführt. Bei der Varianzanalyse (ANOVA) wurde zum Vergleich der Mittelwerte mehrerer Gruppen der REGW-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

Um die Zusammenhänge der gemessenen Wirkungen von Hydroperoxiden auf die Gefäßfunktion besser verständlich zu machen, wird zuerst deren Einfluss auf die Radikalfreisetzung und danach auf die glatte Muskulatur und Endothelfunktion in Blutgefäßen dargestellt.

4.1 Einfluss von Hydroperoxiden auf die vaskuläre Radikalfreisetzung

Die durch H_2O_2 bzw. *tert.*-BHP-stimulierte Radikalfreisetzung wurde durch Luminol- sowie durch Lucigenin-vermittelte Chemilumineszenz gemessen. Luminol stellt einen unspezifischen, Lucigenin einen für Superoxidradikale spezifischen Indikator dar. Es wurden Ringpräparate von Rattenaorta, humaner Arteria mammaria, Arteria cerebri media vom Schwein und humanen Plazentaarterien bzw. -venen verwendet, doch sollen ausführlich nur die Ergebnisse von Rattenaorta und Arteria mammaria dargestellt werden.

4.1.1 Untersuchungen an Rattenaorta

Tabelle 1 stellt die gemessene Radikalfreisetzung der Gefäßpräparate unter Stimulation mit H_2O_2 bzw. *tert.*-BHP dar und zeigt deutlich deren Dosisabhängigkeit. Bei den verschiedenen Konzentrationen wurden die jeweils niedrigsten bzw. höchsten Messwerte aufgeführt.

Rattenaorta Peroxid- konzentration [mM]	Luminol		Lucigenin	
	H_2O_2 [counts per 10 min/mg]	<i>tert.</i> -BHP [counts per 10 min/mg]	H_2O_2 [counts per 10 min/mg]	<i>tert.</i> -BHP [counts per 10 min/mg]
0,05	1.190	0	626	32
	- 2.822		- 4.497	- 158
0,125	8.978	0	462	410
	- 30.890	- 11	- 6.991	- 1665
0,25	976.400	135	2.402	620
	- 1.268.000	- 346	- 9.742	- 1.362
0,5	2.270.000	5.727	1.581	562
	- 3.385.000	- 9.719	- 1.681	- 799
1	24.630.000	1.272	5.627	409
	- 26.920.000	- 15.520	- 20.089	- 886

Tabelle 1: H_2O_2 sowie *tert.*-BHP-stimulierte Radikalbildung in Rattenaorta; die Chemilumineszenzwerte bezogen sich auf mg Trockengewicht. [n=2-3]

Die Chemilumineszenzmessung mit Luminol unter H_2O_2 -Stimulation ergab in Rattenaorta bei allen Konzentrationen eine bis zu 1000fach, mit Lucigenin vor allem bei höheren Konzentrationen eine ca. 20fach größere Gesamtradikalbildung als für *tert.*-BHP. Da Superoxidanionen von Luminol und Lucigenin etwa mit gleicher Chemilumineszenz erfasst werden, zeigen die Ergebnisse der Tabelle, dass mit *tert.*-BHP bis 0,5 mM mehr oder weniger spezifisch $O_2^{\cdot-}$

induziert wurde. Durch H_2O_2 wird zwar ähnlich viel $\text{O}_2^{\cdot-}$ aktiviert, doch wird diese Produktion quantitativ durch andere Radikalspezies bei weitem übertroffen.

4.1.2 Untersuchungen an humaner Arteria mammaria

Untersucht wurde die H_2O_2 - sowie die *tert.*-BHP-stimulierte Radikalfreisetzung in humanen Arteria mammaria-Gefäßen.

Arteria mammaria Peroxid- konzentration [mM]	Luminol		Lucigenin	
	H_2O_2 [counts per 10 min/mg]	<i>tert.</i> -BHP [counts per 10 min/mg]	H_2O_2 [counts per 10 min/mg]	<i>tert.</i> -BHP [counts per 10 min/mg]
0,05	177	0	102	412
	- 418	- 55	- 339	- 504
0,125	18.842	0	108	371
	- 20.628		- 1.404	- 486
0,25	97.352	0	1.689	901
	- 230.860	- 271	- 2.094	- 912
0,5	118.303	16	5.204	761
	- 343.496	- 3.202	- 6.639	- 995
1	523.947	1.419	2.174	1.537
	- 1.025.801	- 15.847	- 3.814	- 3.949

Table 2: H_2O_2 sowie *tert.*-BHP-stimulierte Radikalbildung in humaner Arteria mammaria; die Chemilumineszenzwerte beziehen sich auf mg Trockengewicht. [n=2-4]

Wie aus **Tabelle 2** ersichtlich, lag auch hier die durch H_2O_2 hervorgerufene Luminol-verstärkte Chemilumineszenz bis zu 1000fach über der durch *tert.*-BHP bedingten. Die Messungen mit Lucigenin zeigten keinen wesentlichen Unterschied der durch die Peroxide freigesetzten Menge an Superoxidanionen. Sowohl mit H_2O_2 als auch mit *tert.*-BHP konnte eine Dosisabhängigkeit der insgesamt freigesetzten Radikale von der eingesetzten Peroxidkonzentration gezeigt werden. Vergleicht man die Luminol- bzw. Lucigeninmeßwerte, so zeigt sich auch hier, dass der Anteil der Superoxidproduktion bei H_2O_2 klein ist, bei *tert.*-BHP dagegen wiederum einen wesentlichen Anteil der Radikalproduktion darstellt.

Die Chemilumineszenzmessungen mit Arteria cerebri media vom Schwein sowie humanen Plazentaarterien und -venen ergaben ähnliche Ergebnisse, die aber nicht mehr ausführlich dargestellt werden sollen.

4.1.3 Zusammenfassung des Einflusses von Hydroperoxiden auf die vaskuläre Radikalfreisetzung

Die Wirkung von Hydroperoxiden auf die vaskuläre Radikalfreisetzung verhielt sich in allen vier untersuchten Gefäßtypen ähnlich. Die Radikalproduktion wurde sowohl durch H_2O_2 als auch durch *tert.*-BHP dosisabhängig gesteigert, wobei dieser Effekt, zumindest bei der mit Luminol erfassbaren Radikalproduktion, für H_2O_2 bis zu 1000fach größer sein konnte als für *tert.*-BHP. Die mit Lucigenin messbare Radikalproduktion war durch beide Peroxide wesentlich weniger stimulierbar. Der Anteil der Superoxidradikale an der Gesamtradikalbildung war für H_2O_2 bei den untersuchten Gefäßtypen gering, bei *tert.*-BHP dagegen entsprach die freigesetzte $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Menge in etwa der gesamten Radikalproduktion.

4.2 Einfluss von oxidativem Stress auf die KCl- bzw. Serotonin-induzierte Kontraktion

Da die Stimulierbarkeit der verschiedenen untersuchten Arterien nicht einheitlich war, wurde neben der Kontraktionsauslösung durch KCl-induzierte Depolarisation speziell bei Gehirngefäßen auch Serotonin als Agonist verwendet. Die eingesetzten Peroxide H_2O_2 , *tert.*-BHP bzw. KO_2 wurden jeweils erst nach Erreichen des entsprechenden Kontraktionsplateaus zugesetzt, wobei sie generell eine Zunahme der Kontraktionskraft hervorriefen. *Abb. 7* zeigt den exemplarischen Versuchsverlauf bei KCl-Stimulation mit den für die Auswertung verwendeten Messgrößen.

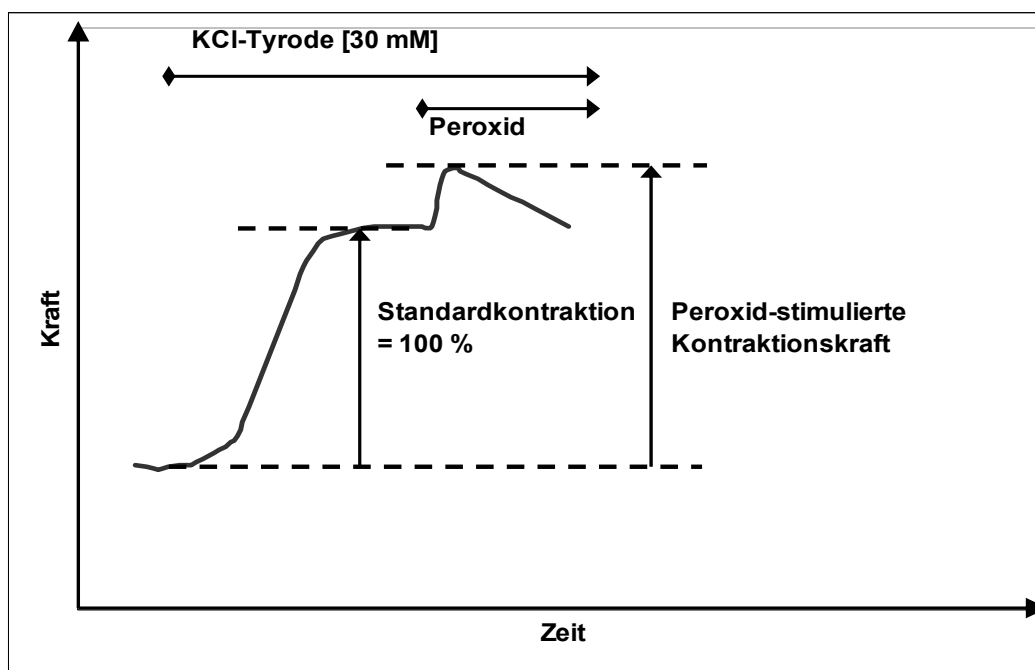


Abb. 7: Exemplarische Darstellung des Versuchsverlaufs zur Messung der Auswirkung von oxidativem Stress auf die KCl-induzierte Kontraktion unterschiedlicher Blutgefäße.

4.2.1 Peroxideffekt auf die KCl-induzierte Kontraktion von Rattenaorten

An Rattenaorten wurde die konzentrationsabhängige Steigerung der Kontraktionskraft durch H_2O_2 , *tert.*-BHP sowie KO_2 gemessen. In *Abb. 8 - Abb. 10* werden diese Effekte jeweils auf die durch 30 mM KCl-induzierte Kontraktionsamplitude bezogen dargestellt (=Standardkontraktion).

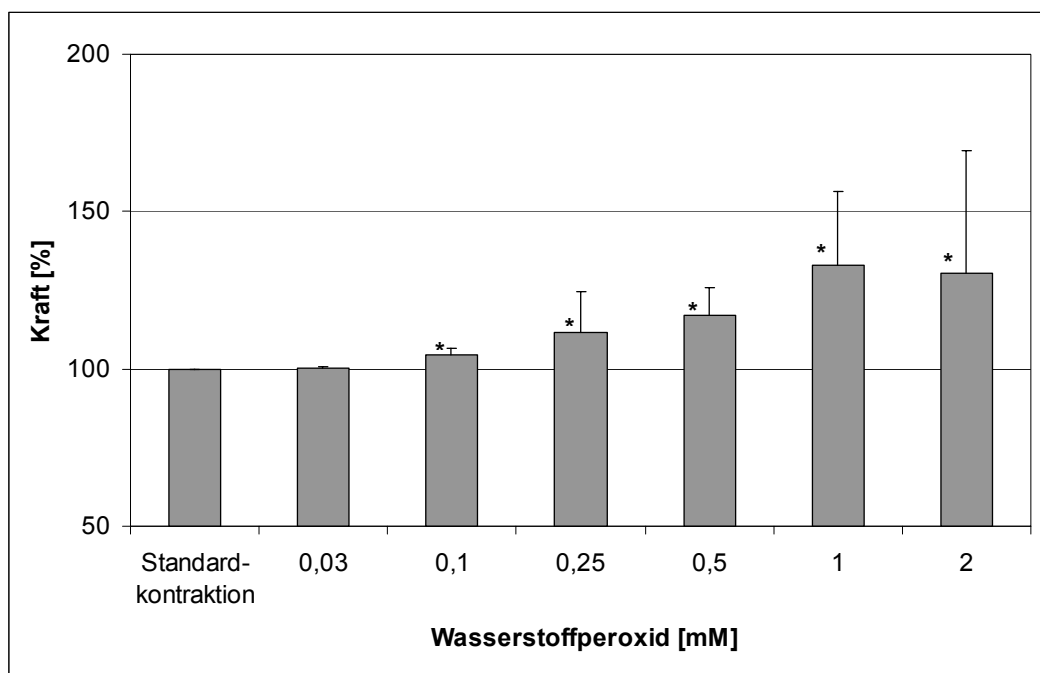


Abb. 8: H_2O_2 -stimulierte Kontraktionszunahme, jeweils bezogen auf die Standardkontraktion (100%); die Messwerte stellen Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) dar. [n=5-6] (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

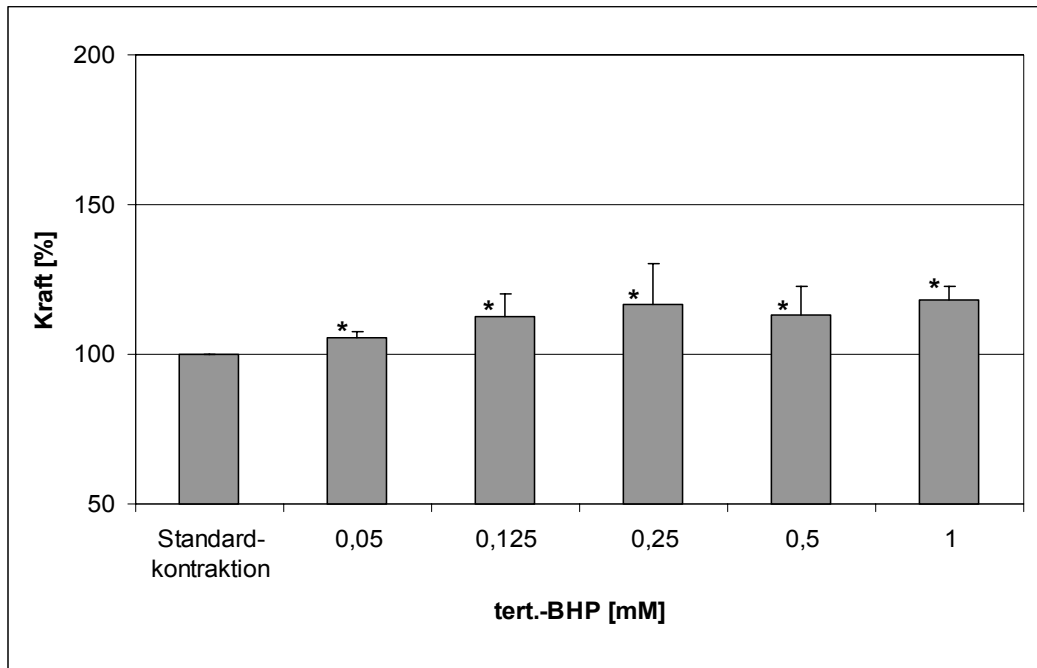


Abb. 9: tert.-BHP-stimulierte Kontraktionszunahme, jeweils bezogen auf die Standardkontraktion (100%); $MW \pm SD$. [n=5-6] (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

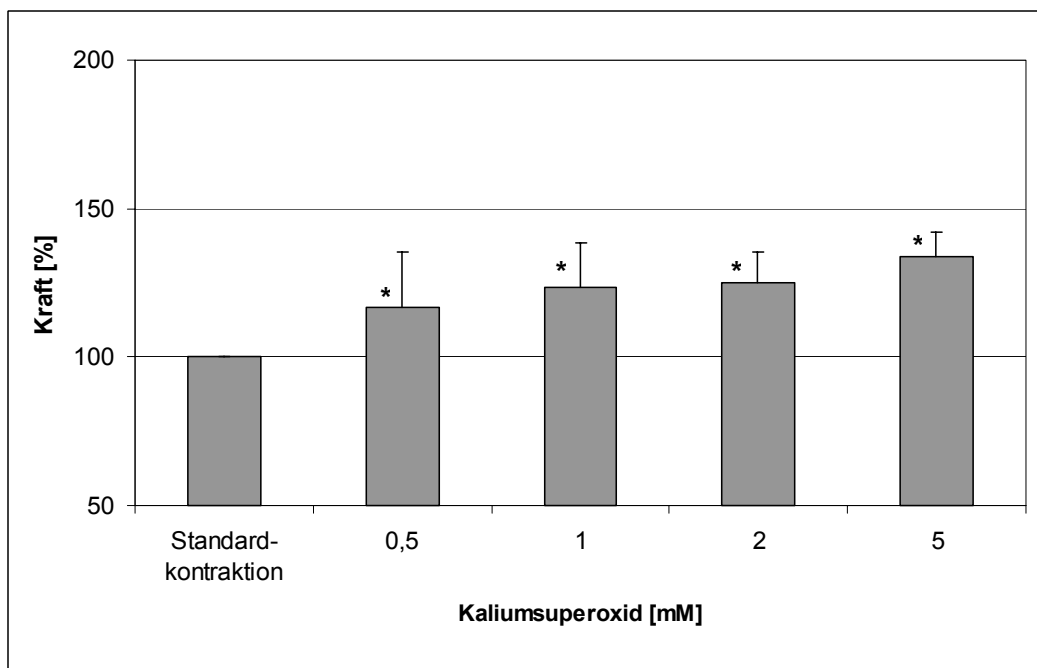


Abb. 10: KO_2 -stimulierte Kontraktionszunahme, jeweils bezogen auf die Standardkontraktion (100%); $MW \pm SD$. [n=6-9] (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

Bei Wasserstoffperoxid nahm die Kontraktionskraft dosisabhängig zu, wobei schon ab 0,1 mM H₂O₂ der Effekt signifikant war. Bei niedrigerer Konzentration konnte keine signifikante Veränderung der Kontraktionskraft gemessen werden. Ab 1 mM H₂O₂ trat keine weitere Steigerung der Kraftzunahme mehr auf, mit 33% war hier das Maximum erreicht.

Bei *tert.*-BHP war die Krafterhöhung bei allen untersuchten Konzentrationen [0,05-1 mM] signifikant. Der Maximaleffekt auf die Steigerung der Kontraktionskraft von 16% war hier schon bei 0,25 mM *tert.*-BHP erreicht.

Auch bei KO₂ war für den Konzentrationsbereich [0,5-5 mM] eine Dosisabhängigkeit der Kraftzunahme (16% - 33%) zu erkennen, wobei hier ebenfalls bei allen gemessenen Konzentrationen der Peroxideffekt statistisch signifikant war. Allerdings scheint das Sättigungsverhalten erst bei höheren Konzentrationen [≥ 5 mM] aufzutreten.

4.2.2 Peroxideffekt auf die KCl-induzierte Kontraktion von Kaninchencarotiden

Abb. 11 zeigt orientierende Messergebnisse des Peroxideffektes auf die KCl-induzierte Kontraktion an Kaninchencarotiden mit H_2O_2 [0,5 mM] sowie *tert.*-BHP [0,5 mM].

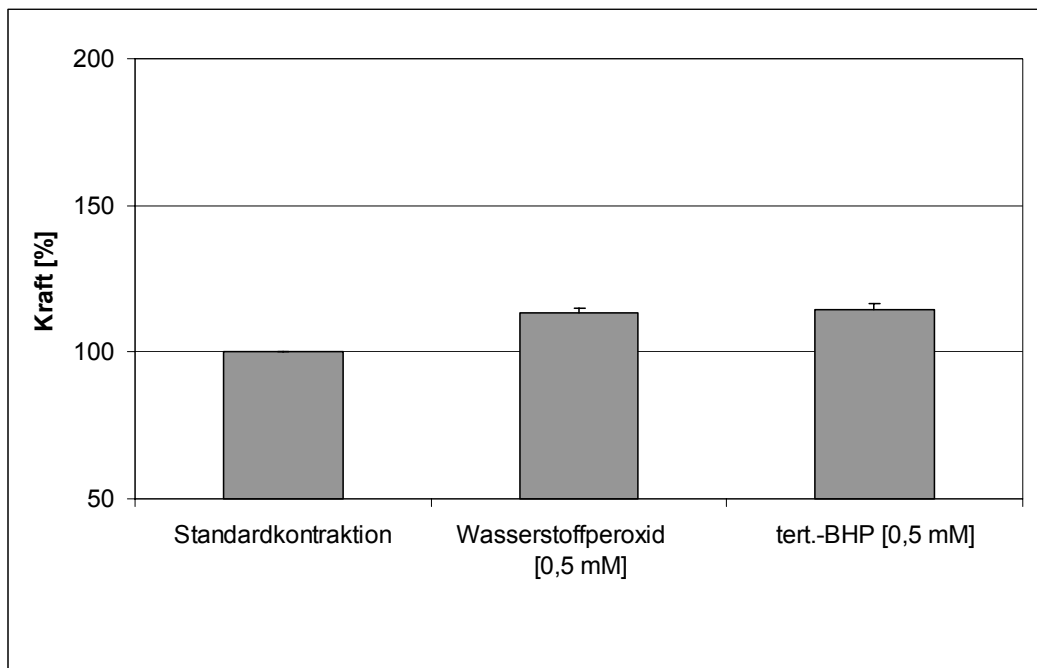


Abb. 11: Peroxid-stimulierte Kontraktionszunahme, jeweils bezogen auf die Standardkontraktion (100%); $MW \pm SD$. [n=2]

Auch hier konnte eine Zunahme der Kontraktionskraft durch die Zugabe der Peroxide beobachtet werden. Das Ausmaß der Kraftzunahme verhielt sich für H_2O_2 und *tert.*-BHP ähnlich und erreichte eine Steigerung von ca. 15%.

4.2.3 Peroxideffekt auf die KCl-induzierte Kontraktion von humanen Plazentagefäßen

Auch an Plazentagefäßen wurde der Peroxideffekt auf die Kontraktionskraft nur orientierend mit H_2O_2 sowie *tert.*-BHP - jeweils [0,25 mM] - gemessen.

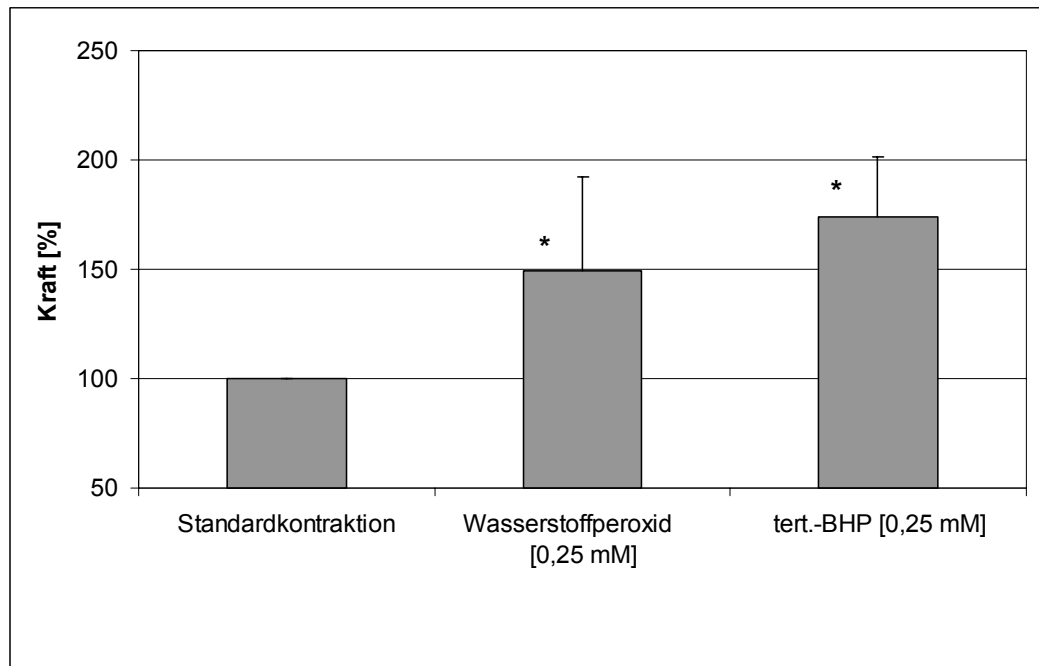


Abb. 12: Peroxid-stimulierte Kontraktionszunahme, jeweils bezogen auf die Standardkontraktion (100%); $MW \pm SD$. [$n \geq 6$] (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

Abb. 12 zeigt, dass die relativ niedrigen Peroxidkonzentrationen eine starke Stimulation der Kontraktionskraft bewirkten, wobei das organische Peroxid einen größeren Effekt hatte (80 %) als H_2O_2 (50 %).

4.2.4 Peroxideffekt auf die Serotonin-induzierte Kontraktion von Arteria cerebri media-Gefäßen vom Schwein

An Präparaten der Arteria cerebri media vom Schwein wurde der Effekt von H_2O_2 und *tert.*-BHP auf die durch Serotonin induzierte Kontraktion gemessen. Die Peroxidzugabe erfolgte am Kontraktionsmaximum. Da in dieser Gefäßart durch Serotonin gleichzeitig die endotheliale NO-Produktion stimuliert wird, wurde, um diesen Effekt zu unterdrücken, der Perfusionslösung noch Nitroarginin [$50 \mu M$] zugesetzt. *Abb. 13* stellt den Versuchsablauf mit den eingezeichneten Messgrößen dar.

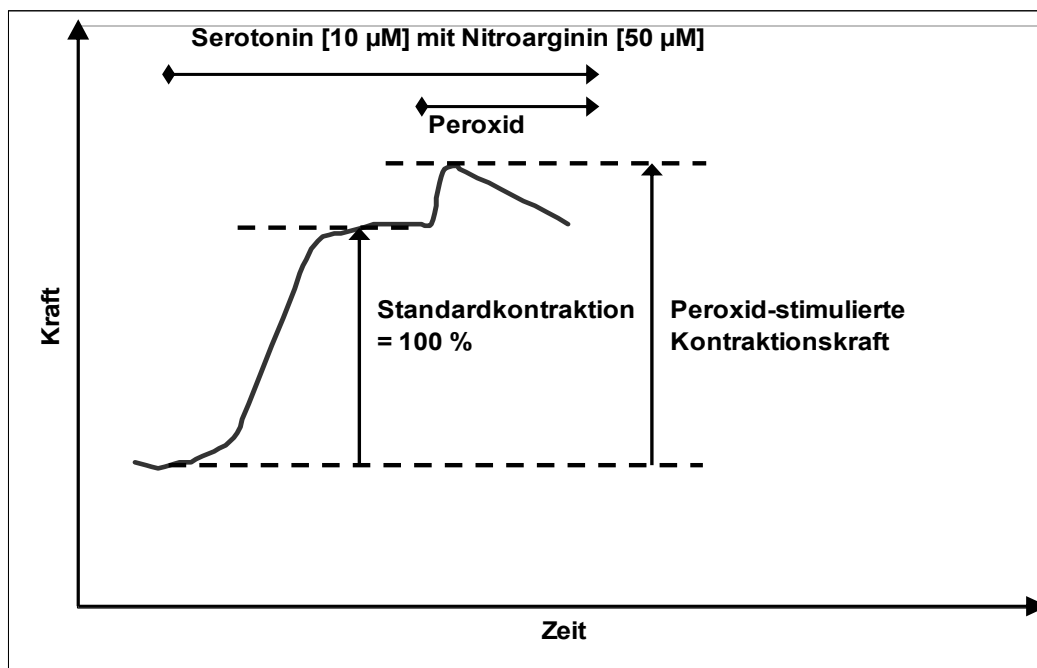


Abb. 13: Exemplarische Darstellung des Versuchsverlaufs zur Messung der Auswirkung von oxidativem Stress auf die Serotonin-induzierte Kontraktion der Arteria cerebri media vom Schwein.

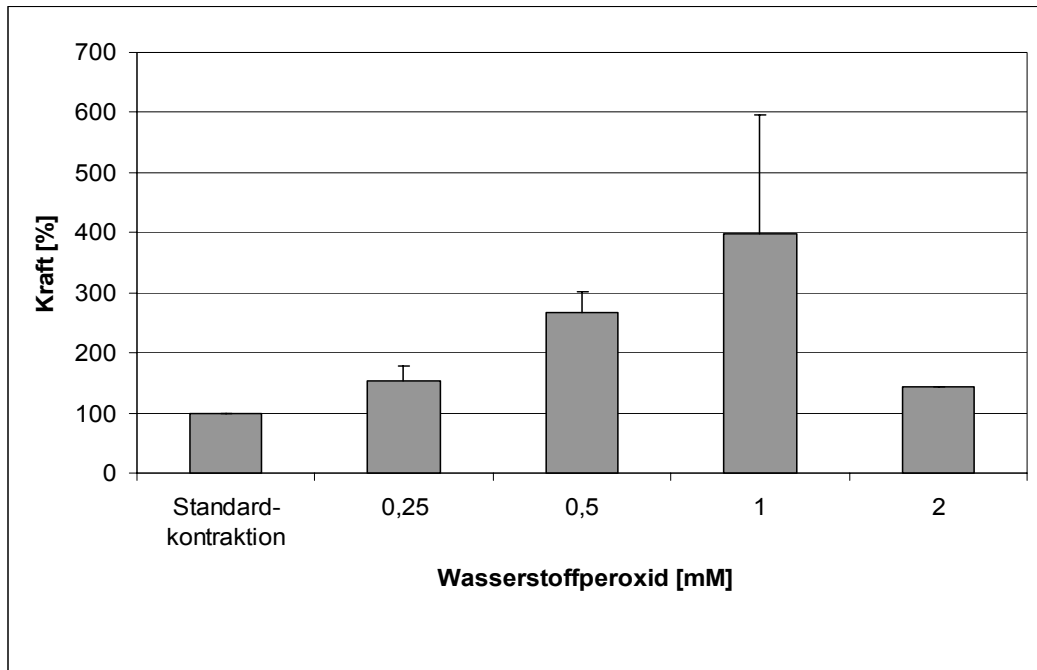


Abb. 14: *H₂O₂-stimulierte Kontraktionszunahme bezogen auf die Standardkontraktion (100%); MW ± SD. [Jeweils n=4]*

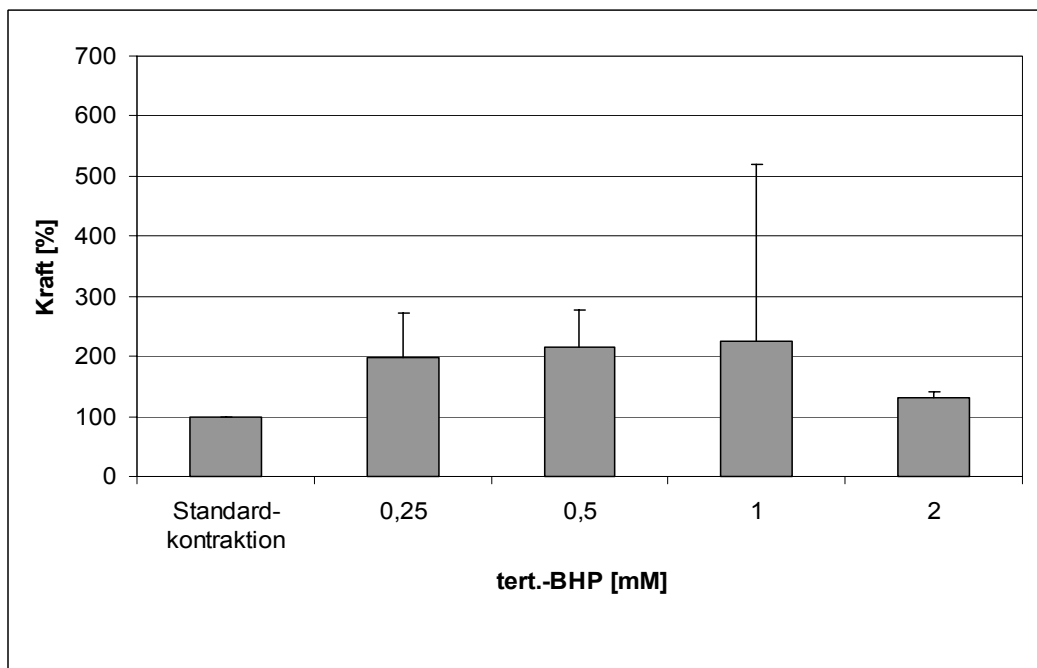


Abb. 15: *tert.-BHP-stimulierte Kontraktionszunahme bezogen auf die Standardkontraktion (100%); MW ± SD. [Jeweils n=4]*

Abb. 14 und **15** zeigen, dass im Vergleich zu den anderen Gefäßspezies bei der Arteria cerebri media vom Schwein durch die Zugabe der Peroxide eine viel höhere relative Kontraktionszunahme ausgelöst wurde. Für 1 mM H₂O₂ z. B. wurde eine 4fache Steigerung gefunden, darüber war eine deutlich hemmende Wirkung zu beobachten. Unter Verwendung von *tert.*-BHP war der Peroxid-induzierte Effekt auf die Kraftzunahme mit Werten bis zu 215% insgesamt geringer als mit H₂O₂. Auch hier wurde eine maximale Stimulierung bei 1 mM Peroxidkonzentration erreicht, darüber lag wiederum eine hemmende Wirkung vor.

4.2.5 Zusammenfassung des Einflusses von oxidativem Stress auf die KCl- bzw. Serotonin-induzierte Kontraktion

Bei allen eingesetzten Gefäßspezies hatte eine Zugabe von Peroxid zur Simulation von oxidativem Stress eine Zunahme der Kontraktionskraft zur Folge. Der Betrag der Krafterhöhung unterschied sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Gefäßart, dem verwendeten Peroxid sowie dessen Konzentration. Legt man die relativen Effekte zugrunde, so war der Einfluss der Peroxide auf die Arteria cerebri media vom Schwein am stärksten. Die Kraftzunahme war hier schon für niedrige Konzentrationen auf einem hohen Niveau (Steigerung auf bis zu 400%). Plazentagefäße reagierten ebenfalls sensibler auf die Peroxidbehandlung (Steigerung der Kontraktionskraft auf 150-200%) als Rattenaorten oder Kaninchencarotiden. Bei letzteren lagen die Werte der Kraftzunahme in niedrigeren Bereichen (100-150%).

4.3 Einfluss von oxidativem Stress auf die Endothel-vermittelte Vasorelaxation

Es sollte der Einfluss von oxidativem Stress, den Wasserstoffperoxid, *tert.*-Butylhydroperoxid, Kaliumsuperoxid sowie Xanthin/XOD auslösen, auf die Endothelfunktion untersucht werden. Die eingesetzten Blutgefäße waren Rattenaorten, Kaninchencarotiden und Arteria cerebri media vom Schwein.

4.3.1 Versuchsablauf zur Ermittlung des Einflusses von oxidativem Stress auf die Endothel-vermittelte Vasorelaxation von Rattenaorten und Kaninchencarotiden

Zunächst wurde die Endothelfunktion unter Stimulation mit KCl-Tyrode [30 mM] und Zusatz von Acetylcholin [0,1 μ M, 1 μ M und 5 μ M] untersucht. Nach Auswaschen mit Tyrode wurde die Stimulation wiederholt. Vor der ACh-Applikation wurden jedoch die verschiedenen Peroxide zugesetzt. Ein exemplarischer Verlauf ist in **Abb. 16** dargestellt.

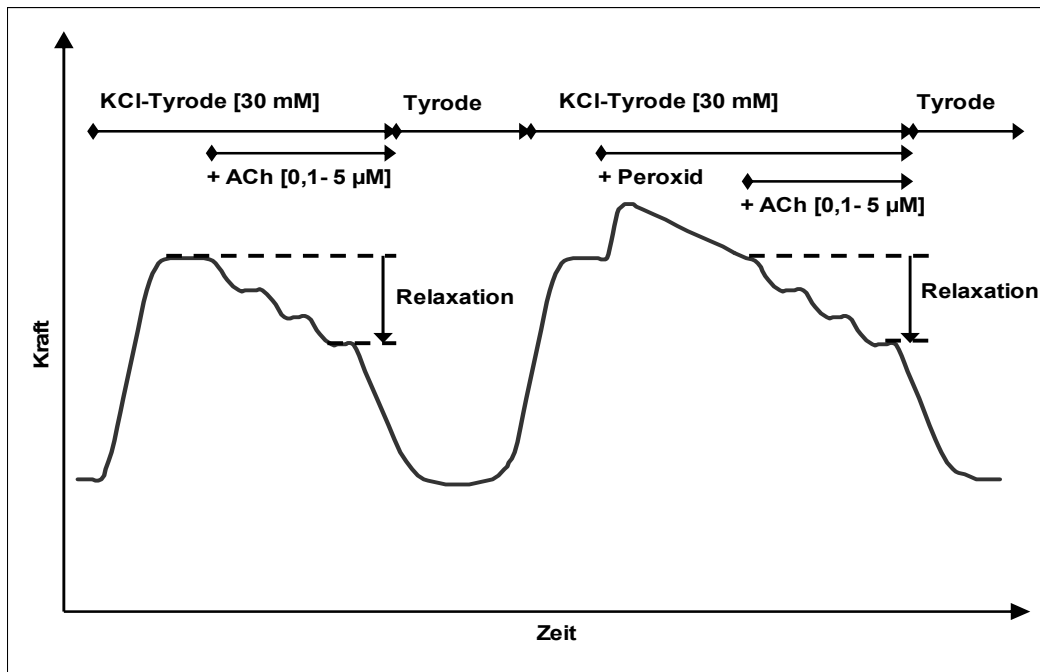


Abb. 16: Exemplarische Darstellung des Versuchsverlaufs zur Ermittlung der Endothel-vermittelten Relaxation vor und nach der Behandlung mit den Peroxiden bzw. dem XOD-System an Rattenaorten und Kaninchencarotiden.

4.3.2 Untersuchungen an Rattenaorten

4.3.2.1 Einfluss von Wasserstoffperoxid

Unter Stimulation mit KCl-Tyrode wurde das Gewebe 30 Minuten lang mit H_2O_2 unterschiedlicher Konzentration [0,03-2 mM] perfundiert, anschließend wurde die ACh-vermittelte Relaxation gemessen.

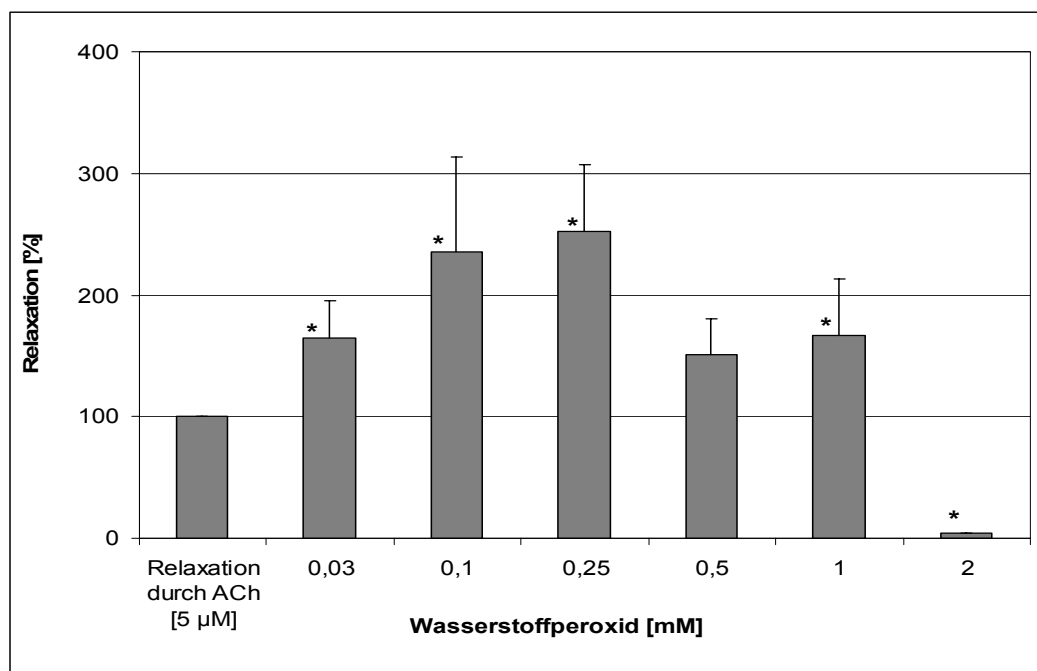


Abb. 17: Effekt von H_2O_2 auf die ACh-vermittelte Relaxation in Rattenaorta. (Relative Darstellung jeweils in Bezug auf die normale ACh-Wirkung als Kontrolle); $MW \pm SD$. [n=4-5] (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

Wie in *Abb. 17* zu erkennen ist, zeigten die Aortensegmente nach Perfusion mit niedrigen Konzentrationen von H_2O_2 [0,03 mM] bzw. [0,1 mM] im Mittel eine Verbesserung der endothelialen Relaxation auf 165% bzw. 235%, wobei alle Präparate einheitlich reagierten. Bei Behandlung mit 0,25 mM H_2O_2 reagierten 3 von 4 Gefäßen ebenso mit einer Verbesserung der Endothelfunktion auf 250%, bei 0,5 und 1 mM konnte jeweils bei 4 von 5 Gefäßen eine verbesserte endotheliale Relaxation gemessen werden (150% und 170%). Bei den restlichen

Präparaten, die auch in die Berechnung des Mittelwerts einbezogen wurden, zeigte sich unter oxidativem Stress eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion von maximal 8%. Erst beim Einsatz von H₂O₂ [2 mM] wurde eine allgemeine Verschlechterung der Endothelfunktion bei allen untersuchten Präparaten beobachtet. Die Verbesserung der Gefäßrelaxation nach H₂O₂-Perfusion war für die Konzentrationen [0,03; 0,1; 0,25 sowie 1 mM] signifikant ($p < 0,05$). Bei der Perfusion mit [0,5 mM] war eine Verbesserung aus dem Schaubild zwar ersichtlich, diese wies jedoch keine Signifikanz auf. Die Abnahme der ACh-vermittelten Vasorelaxation durch H₂O₂ [2 mM] verhielt sich wiederum signifikant ($p < 0,05$).

4.3.2.2 Einfluss von *tert.*-Butylhydroperoxid

Abb. 18 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen, bei denen der Einfluss von *tert.*-BHP auf die ACh-vermittelte Relaxation gemessen wurde.

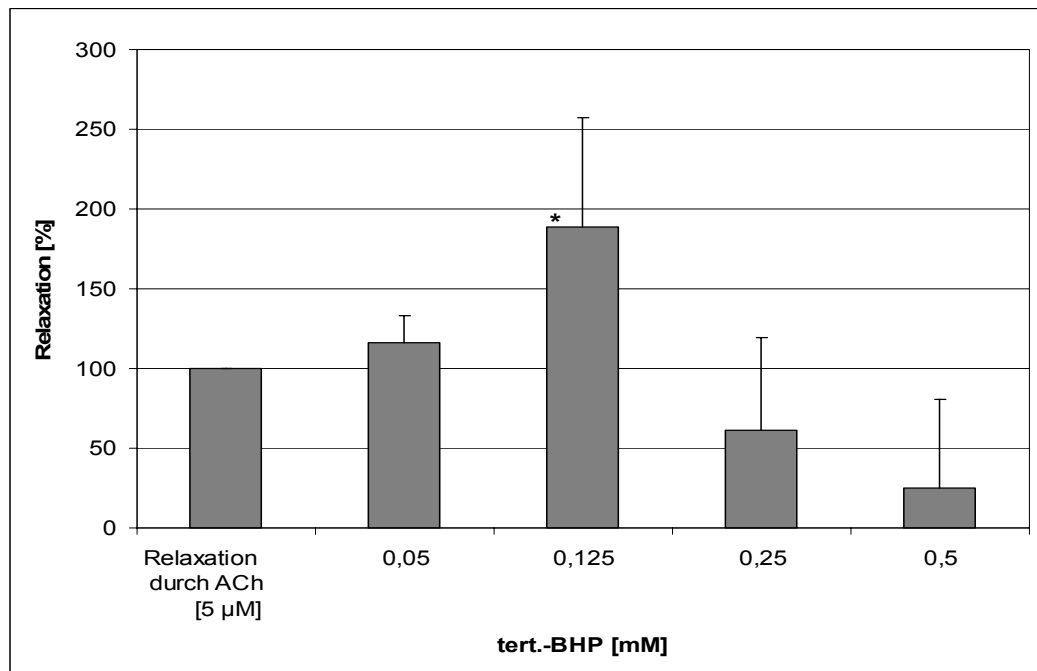


Abb. 18: Effekt von *tert.*-BHP auf die ACh-vermittelte Relaxation in Rattenaorta. (Relative Darstellung jeweils in Bezug auf die normale ACh-Wirkung als Kontrolle); $MW \pm SD$. [$n=4-8$] (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

Die Perfusion mit *tert.*-BHP [0,05 mM] führte bei 5 von 6 Gefäßen zu einer geringen Verbesserung der Endothelfunktion um 16%, was jedoch statistisch nicht signifikant war. Bei einem Präparat trat eine verminderte Relaxation von 8% auf. Nach der Behandlung mit [0,125 mM] Peroxid reagierten alle 5 Gefäßringe mit einer signifikanten Erhöhung der ACh-vermittelten Vasorelaxation auf 190% ($p < 0,05$). Schon ab einer Konzentration von [0,25 mM] fand bei 6 von 8 Gefäßen eine deutliche Verschlechterung der endothelialen Relaxation von 40% statt, bei den zwei restlichen wurde diese geringfügig verbessert. Bei [0,5 mM] war bei einem Präparat die Endothelfunktion praktisch unbeeinflusst, bei den restlichen 4 gemessenen Gefäßringen war keine Endothel-abhängige Relaxation

mehr vorhanden. Ein weiteres Gefäßpräparat zeigte eine 2,5fache Relaxationszunahme; diese Messung wurde als „Ausreißer“ gewertet und nicht in den dargestellten Mittelwert einberechnet. Auch hier wurde bei niedrigen Peroxidkonzentrationen die Endothelfunktion verbessert, allerdings war schon ab *tert.*-BHP [0,25 mM] eine Endothelschädigung zu verzeichnen.

4.3.2.3 Einfluss von Kaliumsuperoxid

Um den Einfluss von KO_2 auf die ACh-vermittelte Relaxation zu bestimmen, wurden die Ringpräparate mit KO_2 unterschiedlicher Konzentration [0,1-5 mM] perfundiert. Da diese Substanz sich im gelösten Zustand sehr schnell zersetzt, wurde die Dauer der Peroxidperfusion hier auf 10 Minuten verkürzt.

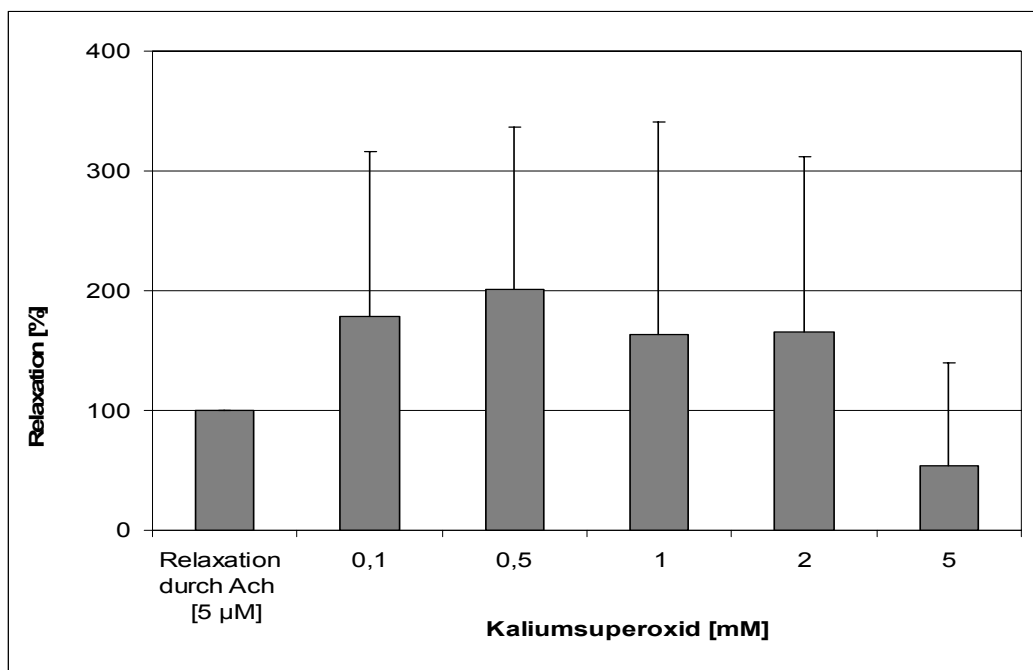


Abb. 19: Effekt von KO_2 auf die ACh-vermittelte Relaxation in Rattenaorta. (Relative Darstellung jeweils in Bezug auf die normale ACh-Wirkung als Kontrolle); $\text{MW} \pm \text{SD}$. [n=5-8]

Wie aus *Abb. 19* ersichtlich ist, streuten die Werte der Endothel-abhängigen Relaxation nach der Perfusion mit KO_2 stark. Die Standardabweichungen waren

sehr hoch. Grund hierfür war die Tatsache, dass durch die Behandlung mit Superoxidanionen innerhalb einer Konzentration sowohl Präparate mit einer Verbesserung als auch solche mit Verschlechterung der Endothelfunktion gefunden wurden. Um die Befunde besser zu verdeutlichen, wurden in *Abb. 20* die einzelnen Messwerte dargestellt.

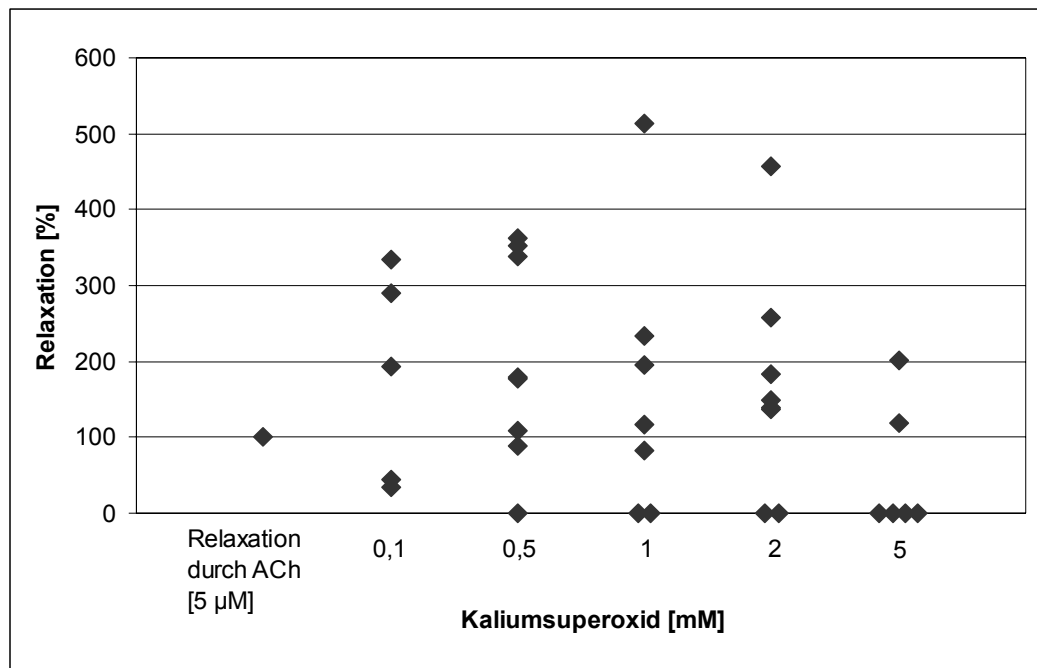


Abb. 20: Effekt von KO_2 auf die ACh-vermittelte Relaxation in Rattenaorta; Einzelwerte. (Relative Darstellung in Bezug auf die normale ACh-Wirkung als Kontrolle).

Die Werte zeigen, dass der Zusatz von KO_2 [0,1 mM] als Reaktion sowohl Steigerung (bis zu 3fache Erhöhung) als auch Hemmung auf 50% der ACh-induzierten Relaxation zur Folge haben kann. Eine völlige Schädigung des Endothels konnte bei dieser Konzentration noch nicht beobachtet werden. Bei [0,5 mM] reagierten 2 von 8 Gefäßen mit einer Verschlechterung der Relaxation, wobei bei einem der Aortenringe keine Endothelfunktion mehr messbar war. Bei den restlichen 6 Präparaten war die Relaxation sogar bis um das 3,5fache verbessert. Mit [1 mM] KO_2 konnte bei 2 von 7 Gefäßen gar keine, bei einem weiteren Gefäß eine Verschlechterung der Endothelfunktion beobachtet werden. Die restlichen 4 Gefäße reagierten mit einer bis zu 5fachen

Verbesserung der Relaxationsfähigkeit. Bei [2 mM] war bei 2 von 8 Gefäßen keine Reaktion auf die ACh-induzierte Relaxation mehr zu erkennen, die restlichen 6 Gefäße brachten dagegen eine deutliche Verbesserung derselben mit sich. Die höchste eingesetzte Konzentration, KO_2 [5 mM], ergab für 4 von 6 Gefäßen eine völlige Schädigung des Endothels. Bei den restlichen 2 Gefäßen konnte eine Verbesserung der Relaxation beobachtet werden, diese nahm jedoch nicht mehr so hohe Werte wie bei den niedrigeren Konzentrationen an. Wegen der großen Streuung der Messwerte konnten hier keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle gefunden werden. Auffallend war die Beobachtung, dass die Gefäßpräparate nach Perfusion mit KO_2 entweder mit einer deutlichen Verbesserung (bis zu 5fach) der ACh-induzierten Relaxation reagierten oder aber es war gar keine Endothel-abhängige Relaxation mehr messbar. Ein geringfügiger Einfluss auf die Endothelfunktion kam nur bei 5 der insgesamt 33 gemessenen Präparate vor.

Insgesamt war bei den KO_2 -Konzentrationen [0,1-2 mM] trotz hoher Standardabweichung im Mittel eine Verbesserung der Endothelfunktion zu verzeichnen, erst ab KO_2 [5 mM] trat eine Schädigung des Endothels in den Vordergrund.

4.3.2.4 Einfluss von Xanthin/XOD

Bei diesen Versuchen wurden die Präparate aus Rattenaorta 15 Minuten lang mit Xanthin/XOD [$8 \mu\text{M}/12,5 \text{ mU}/\text{ml}$] inkubiert. Der Einfluss der Xanthinoxidase-Reaktion auf die ACh-induzierte Relaxation ist in **Abb. 21** dargestellt.

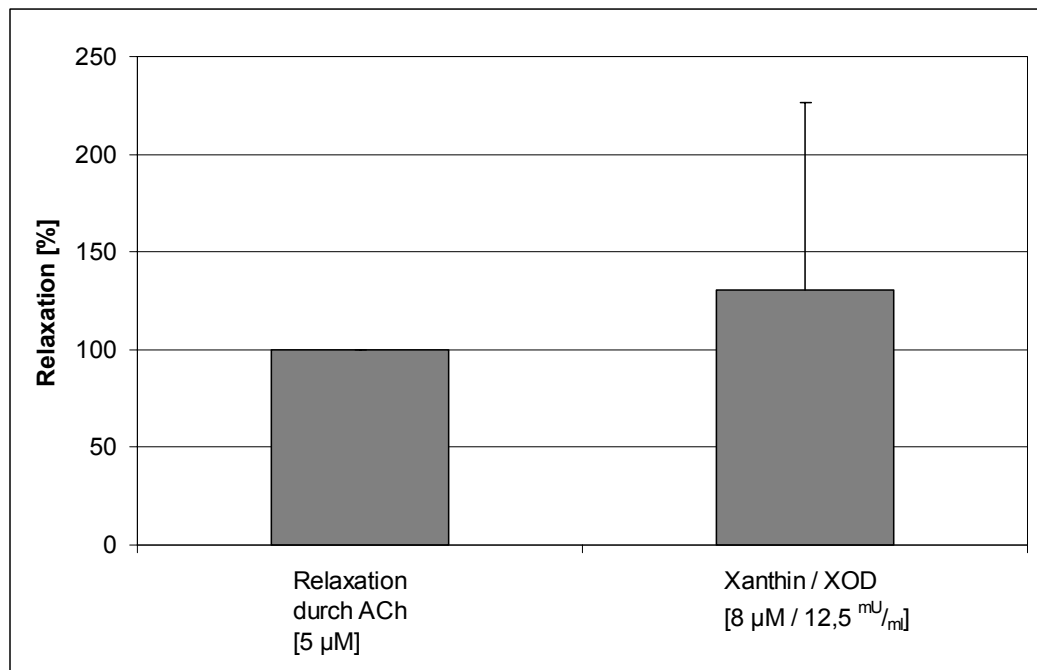


Abb. 21: Effekt von Xanthin/XOD auf die ACh-vermittelte Relaxation in Rattenaorta. (Relative Darstellung jeweils in Bezug auf die normale ACh-Wirkung als Kontrolle); $MW \pm SE$. [n=10]

Durch die 15-minütige Perfusion des Gewebes mit Xanthin/XOD konnte, ähnlich wie bei der Verwendung von KO_2 , zwar insgesamt eine verbesserte Endothelfunktion beobachtet werden, jedoch gab es auch hier jeweils sowohl Verbesserung als auch Verschlechterung der ACh-induzierten Relaxation. Da hieraus eine große Standardabweichung ohne Signifikanz resultierte, wurden in **Abb. 22** die einzelnen Messwerte dargestellt.

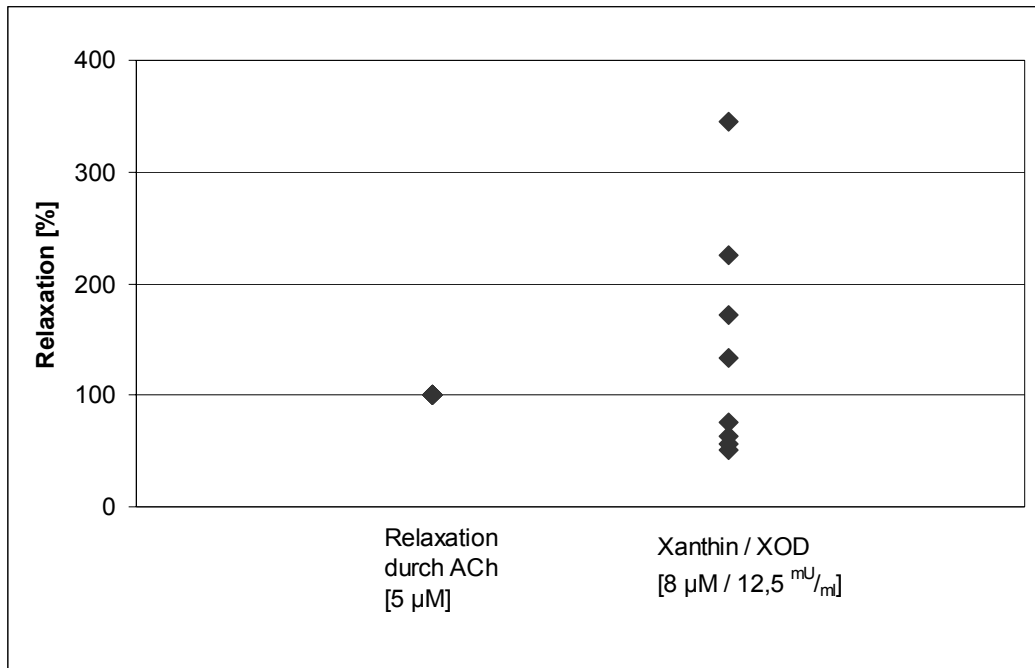


Abb. 22: Effekt von Xanthin/XOD auf die ACh-vermittelte Relaxation in Rattenaorta; Einzelwerte. (Relative Darstellung jeweils in Bezug auf die normale ACh-Wirkung als Kontrolle. [n=10])

Man erkennt, dass bei der Hälfte der Messungen die Endothel-abhängige Relaxation verbessert wurde. Diese Verbesserung konnte bis zum 3,5fachen des Ausgangswertes ansteigen. Die restlichen Präparate wiesen nach der Perfusion mit Xanthin/XOD eine geringere Endothelfunktion auf als vorher. Da das radikalbildende System Xanthin/XOD ebenso wie KO_2 Superoxidationen freisetzt, könnte dieser Effekt von dieser Radikalspezies abhängig sein.

Der durch die verschiedenen Peroxide induzierte oxidative Stress wies bei den Untersuchungen mit Rattenaorten nicht nur schädigende Eigenschaften auf, sondern konnte in bestimmten Konzentrationen die Endothel-vermittelte Vasorelaxation verbessern. Bei H_2O_2 war ein schädigender Einfluss erst bei einer relativ hohen Konzentration von 2 mM ersichtlich, während mit *tert.*-BHP schon bei 0,25 mM Lösung die Endothelfunktion beeinträchtigt wurde. Mit KO_2 oder Xanthin/XOD wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Hier trat nach der Perfusion der Gefäße mit dem jeweiligen Radikalbildner entweder eine Beeinträchtigung oder eine Stärkung der endothelialen Relaxation auf. Diese

Verbesserung war größer als dies mit H_2O_2 oder *tert.*-BHP der Fall war. Da sowohl durch KO_2 als auch durch Xanthin/XOD Superoxidradikale freigesetzt werden, ist denkbar, dass die Unterschiede der Messwerte aufgrund dieser Radikalspezies auftreten.

4.3.3 Untersuchungen an Kaninchencarotiden

4.3.3.1 Einfluss von Wasserstoffperoxid

Die Carotispräparate wurden 30 Minuten lang mit H_2O_2 unterschiedlicher Konzentration [0,5 mM] oder [2 mM] perfundiert. Anschließend wurde die ACh-vermittelte Relaxation unter Peroxideinfluss gemessen.

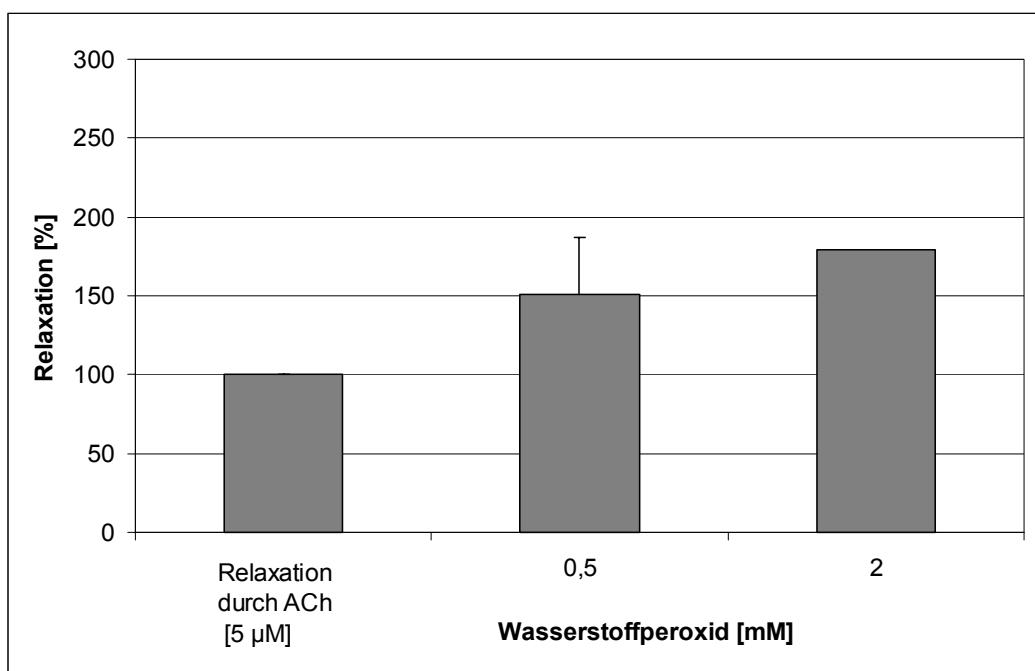


Abb. 23: Effekt von H_2O_2 auf die ACh-vermittelte Relaxation in Kaninchencarotis. (Relative Darstellung jeweils in Bezug auf die normale ACh-Wirkung als Kontrolle); $MW \pm SE$. [$n=2$ bei 0,5 mM; $n=1$ bei 2 mM]

Obwohl die Versuchszahl gering war, konnte auch hier eine 50%- bzw. 80%ige Steigerung der Endothel-vermittelten Relaxation nach Perfusion mit dem Peroxid [0,5 mM bzw. 2 mM] beobachtet werden.

4.3.3.2 Einfluss von *tert.*-Butylhydroperoxid

Abb. 24 zeigt den Einfluss von *tert.*-BHP auf die Endothelfunktion.

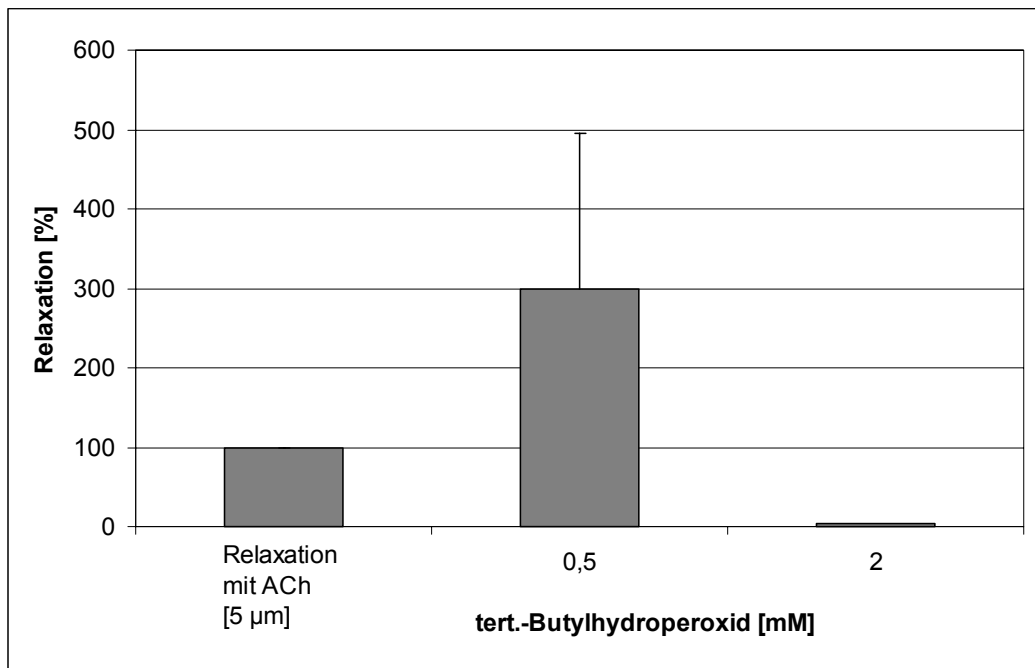


Abb. 24: Effekt von *tert.*-BHP auf die ACh-vermittelte Relaxation in Kaninchencarotis. (Relative Darstellung jeweils in Bezug auf die normale ACh-Wirkung als Kontrolle); MW ± SE. [n=2 bei 0,5 mM; n=1 bei 2 mM]

Bei 0,5 mM *tert.*-BHP fand eine deutliche Verbesserung der Endothel-abhängigen Vasorelaxation statt, bei 2 mM wurde die Endothelfunktion jedoch vollständig gehemmt.

Obwohl es sich hier nur um orientierende Versuche handelte, war bei den Kaninchencarotiden ebenso wie bei den Rattenaorten deutlich zu erkennen, dass eine kurzzeitige Behandlung des Gewebes mit niedrigen Konzentrationen von H₂O₂ oder *tert.*-BHP eine Verbesserung der ACh-vermittelten Vasorelaxation mit sich brachte. Oxidativer Stress wies also auch hier unter den gegebenen

Bedingungen nur bei höheren Peroxidkonzentrationen schädigende Eigenschaften auf.

4.3.4 Untersuchungen an Arteria cerebri media vom Schwein

An Präparaten aus Arteria cerebri media vom Schwein wurde der Einfluss von H₂O₂ [0,25 mM] sowie *tert.*-BHP [0,25 mM] auf die endotheliale Relaxation gemessen, wobei Serotonin [10 µM] zur Auslösung der Kontraktion verwendet wurde. Da in diesen Gefäßen die Stimulation mit Serotonin gleichzeitig die endotheliale NO-Produktion aktivierte, konnte die Endothelfunktion nur durch eine Blockade der NO-Synthase mit Nitroarginin [50 µM] erfasst werden.

4.3.4.1 Versuchsablauf

Wie in *Abb. 25* dargestellt, wurde zunächst die Endothelfunktion unter Stimulation mit Serotonin [10 µM] und unter Zusatz von Nitroarginin [50 µM] gemessen. Die daraus folgende Kontraktionserhöhung wurde als Korrelat der Endothel-abhängigen Relaxation gewertet. Um den Einfluss der Peroxide auf die Endothelfunktion zu ermitteln, wurde dieselbe Messung nach 30minütiger Perfusion mit H₂O₂ oder *tert.*-BHP erneut durchgeführt. Die Peroxidzugabe erfolgte hier vor der zweiten Kontraktionsauslösung, weil eine oxidative Schädigung des Serotonins bei gleichzeitiger Applikation der Hydroperoxide ausgeschlossen werden sollte.

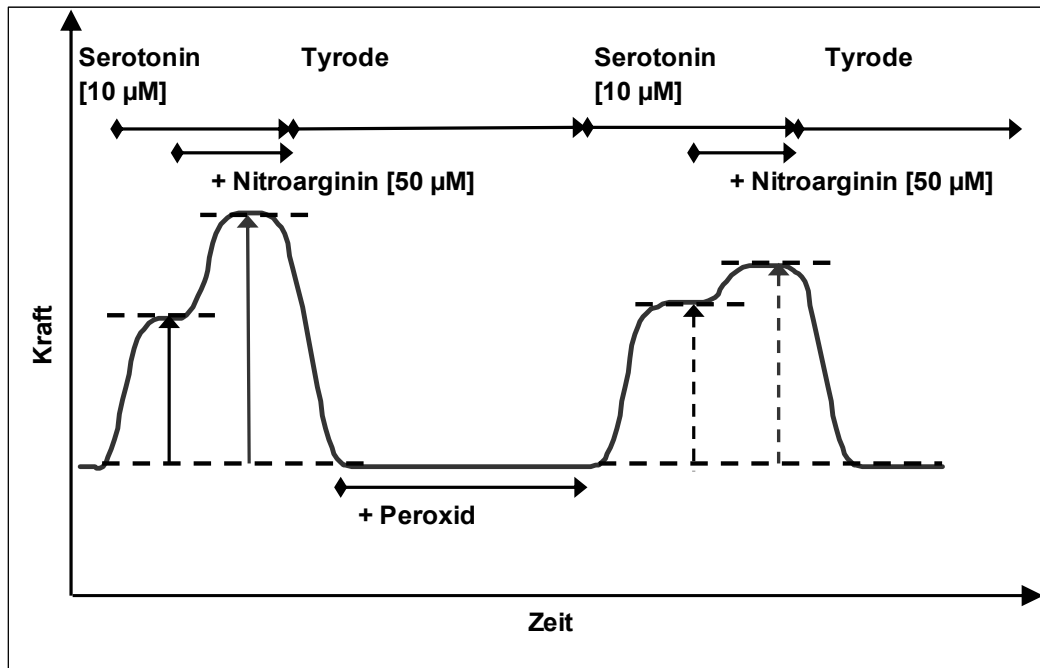


Abb. 25: Exemplarische Darstellung des Versuchsverlaufs für Arteria cerebri media-Präparate vom Schwein

4.3.4.2 Einfluss von Wasserstoffperoxid und *tert.*-BHP

Abb. 26 zeigt die Kontraktionszunahme durch Nitroarginin [50 μ M] vor und nach der Behandlung der Gefäßpräparate mit Peroxid.

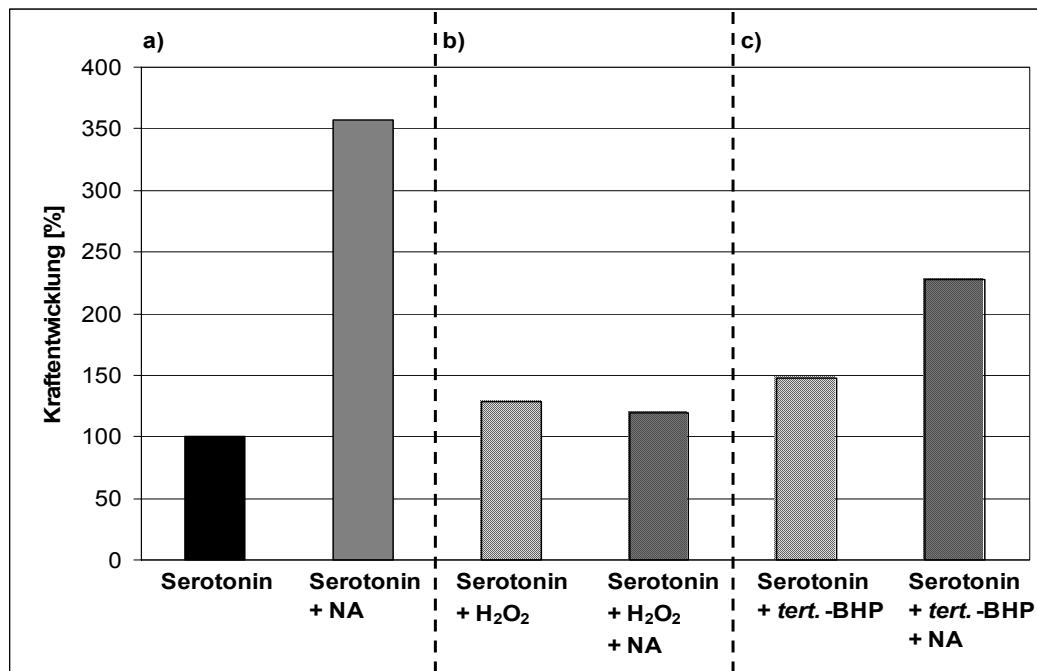


Abb. 26: Einfluss von H₂O₂ [0,25 mM] und *tert.*-BHP [0,25 mM] auf die Endothelfunktion ermittelt mit Serotonin [10 μ M] und Nitroarginin (NA) [50 μ M]; MW. [Jeweils n=4-6]

Bei Arteria cerebri media-Präparaten vom Schwein induzierte eine Hemmung der NO-Synthase durch Nitroarginin eine bis zu 3,5fache Kontraktionssteigerung. Offensichtlich wurde in diesen Gefäßen die NO-Synthase durch Serotonin mitaktiviert, so dass die Endothel-abhängige Vasorelaxation nur indirekt durch Hemmung dieses Enzyms ermittelt werden konnte. Als Effekt der Peroxide zeigte sich, dass die Nitroarginin-abhängige Kontraktionssteigerung schon bei 0,25 mM H₂O₂ aufgehoben bzw. bei 0,25 mM *tert.*-BHP reduziert war, was auf eine Schädigung des Endothels hinweist.

4.3.5 Zusammenfassung der Wirkung von oxidativem Stress auf die Endothel-vermittelte Vasorelaxation

Oxidativer Stress induzierte in den verschiedenen Gefäßen unterschiedliche Effekte auf die Endothelfunktion. Dabei hing das Ausmaß des schädigenden Einflusses auf die Vasorelaxation sowohl von der eingesetzten Peroxidkonzentration als auch vom verwendeten Gefäßtyp ab. Sehr empfindlich reagierten die untersuchten Hirngefäße vom Schwein auf die Perfusion mit Radikalbildnern. Hier war schon bei geringer Peroxidkonzentration eine Schädigung der Endothelfunktion zu verzeichnen. Dagegen wiesen Peroxide, in Substanz oder enzymatisch gebildet, in Rattenaorten sowie Kaninchencarotiden nicht nur schädigende Eigenschaften auf, sondern konnten in den niedrigeren Konzentrationsbereichen zumindest bei kurzzeitiger Applikation die Endothel-vermittelte Vasorelaxation verbessern.

4.4 Untersuchungen an Aorten aus hypertensiven und diabetischen Ratten

Aus Arbeitsgruppen des Pharmakologischen Instituts wurden Aorten aus Ratten zur Verfügung gestellt, bei denen entweder arterielle Hypertonie oder Diabetes mellitus induziert worden war. Da bei beiden Krankheitsbildern eine endotheliale Dysfunktion postuliert wird, sollte auch an diesen Modellen die Endothel-vermittelte Vasorelaxation charakterisiert werden.

4.4.1 Untersuchungen an Aorta aus hypertensiven Ratten

4.4.1.1 Einfluss des ACE-Hemmers Captopril

Gemessen wurde der Einfluss, den Captopril [10 μM] auf die Endothelfunktion von Hochdruckratten im Vergleich zu Standardratten hatte.

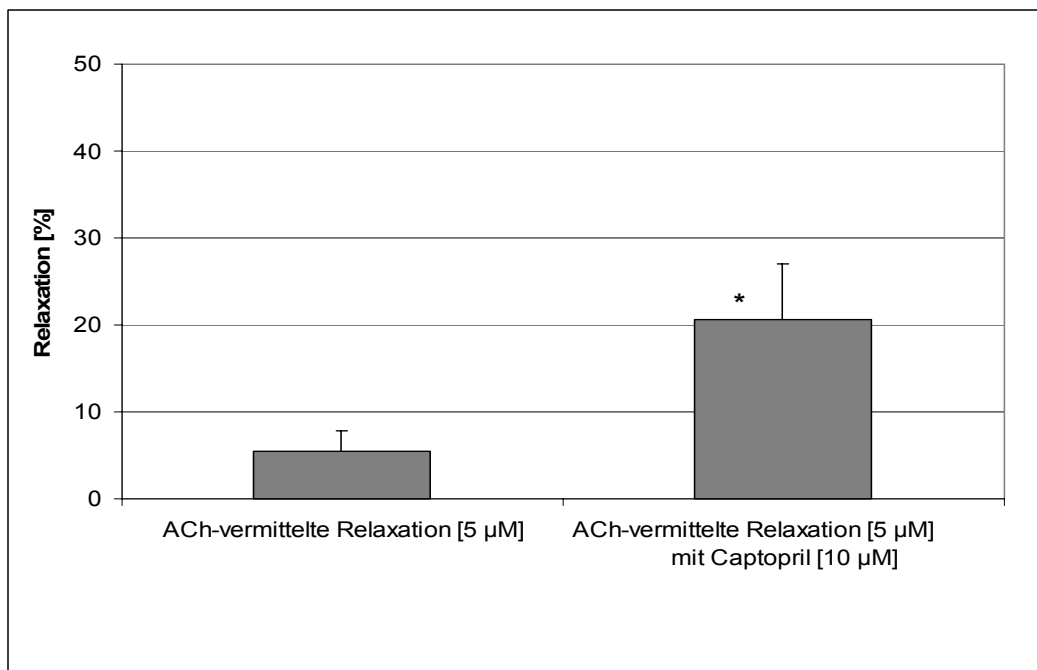


Abb. 27a: ACh-vermittelte Relaxation ohne und mit Captopril [10 μM] bei Standardratten [n=6]. (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

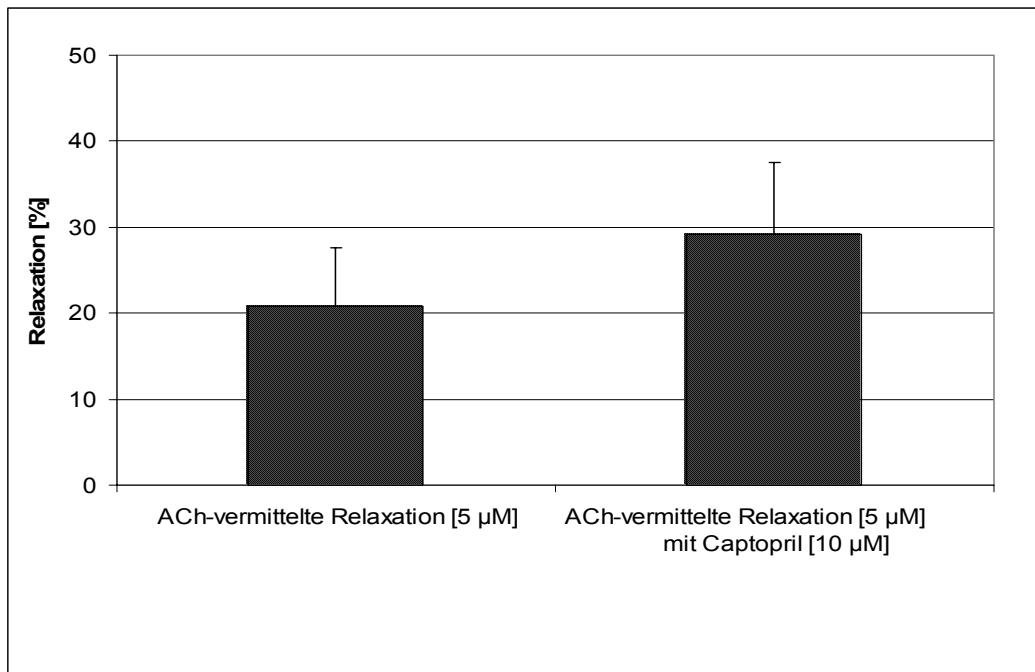


Abb. 27b: ACh-vermittelte Relaxation ohne und mit Captopril [10 µM] bei Hochdruckratten [n=10]. (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

Abb. 27a/b zeigen, dass durch die Applikation des ACE-Hemmers Captopril [10 µM] eine signifikante Verbesserung der endothelialen Relaxation erreicht werden konnte. Diese Signifikanz ergab sich sowohl bei den Ratten mit Bluthochdruck (**Abb. 27a**) als auch bei den Standardtieren (**Abb. 27b**). Auffallend ist, dass die durch ACh-vermittelte Relaxation bei den Hochdruckratten wesentlich größer war als bei den Standardratten. Ein schädigender Einfluss des Bluthochdrucks auf die vaskuläre Relaxation konnte mit dieser Versuchsreihe nicht gezeigt werden. Die Captopril-bedingte Verbesserung der Endothelfunktion war für Standardratten höher als für die Hochdrucktiere, dieser Unterschied wies jedoch keine Signifikanz auf.

4.4.1.2 Einfluss des AT₁-Antagonisten Candesartan

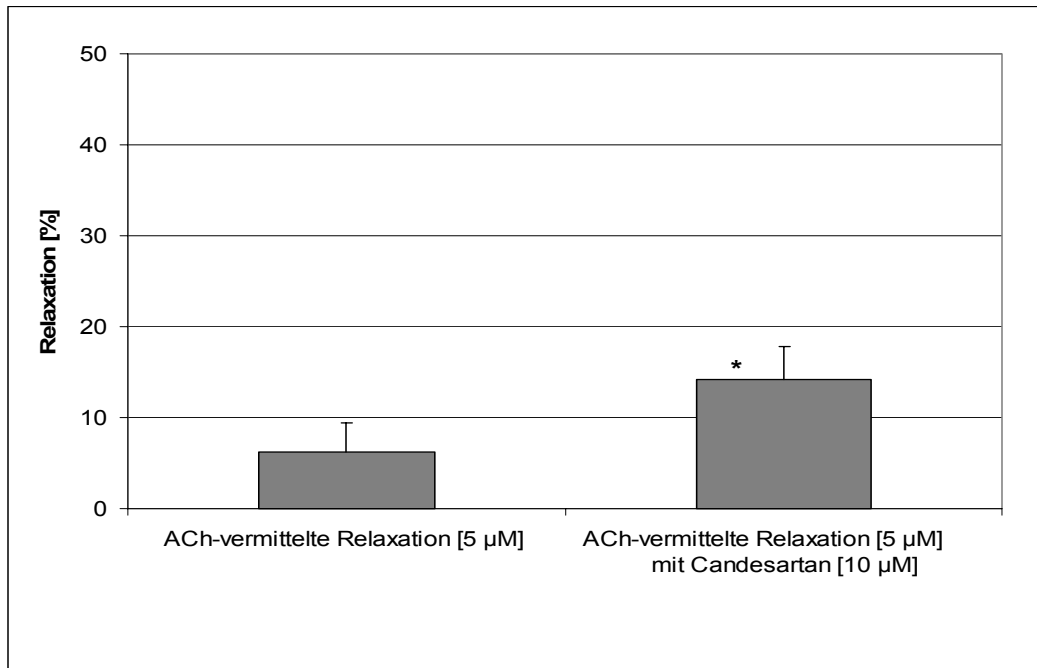


Abb. 28a: ACh-vermittelte Relaxation ohne und mit Candesartan [10 µM] bei Standardratten [n=8]]. (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

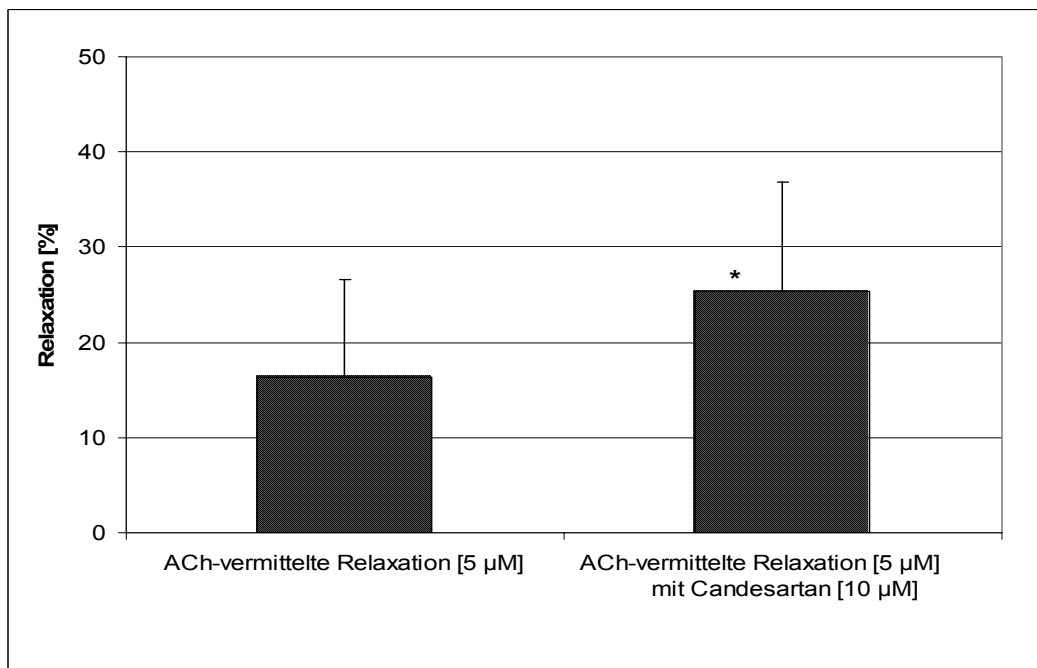


Abb. 28b: ACh-vermittelte Relaxation ohne und mit Candesartan [10 µM] bei Hochdruckratten [n=7]. (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

Auch hier konnte durch die Applikation des eingesetzten Arzneistoffes Candesartan [10 μ M] eine signifikante Verbesserung der endothelialen Relaxation erzielt werden, die sowohl bei den Hochdruckratten als auch bei den Standardtieren auftrat. Der Betrag, um den sich die ACh-vermittelte Relaxation mit Candesartan verbesserte, war bei beiden Gruppen ähnlich hoch. Die Endothelfunktion war, wie aus *Abb. 28a/b* ersichtlich ist, bei den Standardratten niedriger als bei den Hochdruckratten; eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion durch Bluthochdruck lag nicht vor.

4.4.1.3 Einfluss des AT₁-Antagonisten Losartan

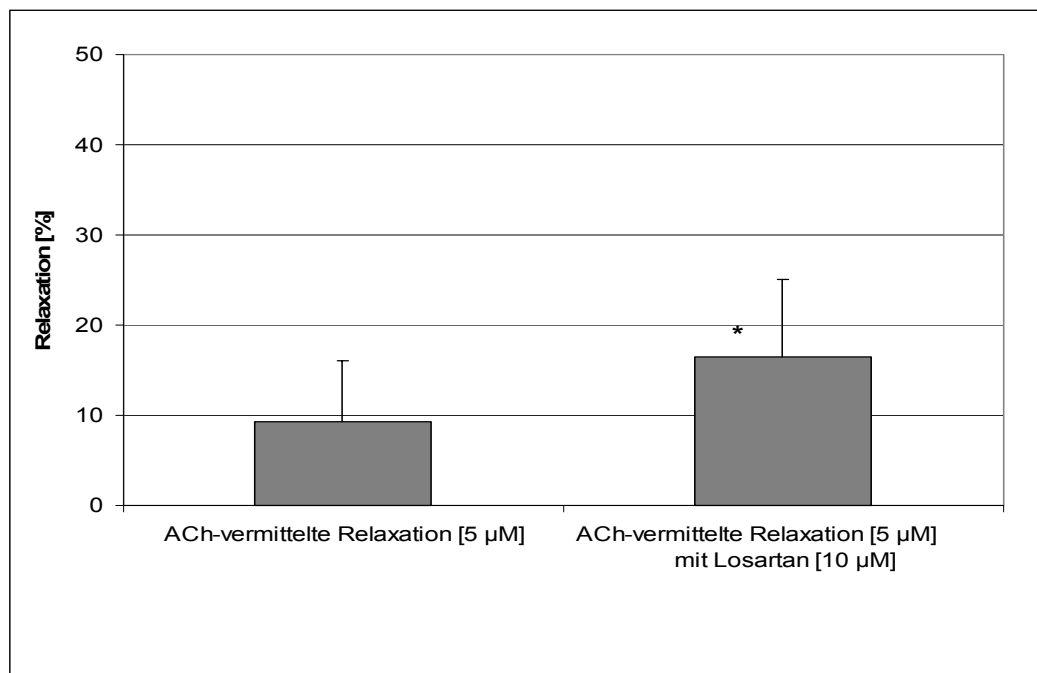


Abb. 29a: ACh-vermittelte Relaxation ohne und mit Losartan [10 μ M] bei Standardratten [n=6]. (signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)*

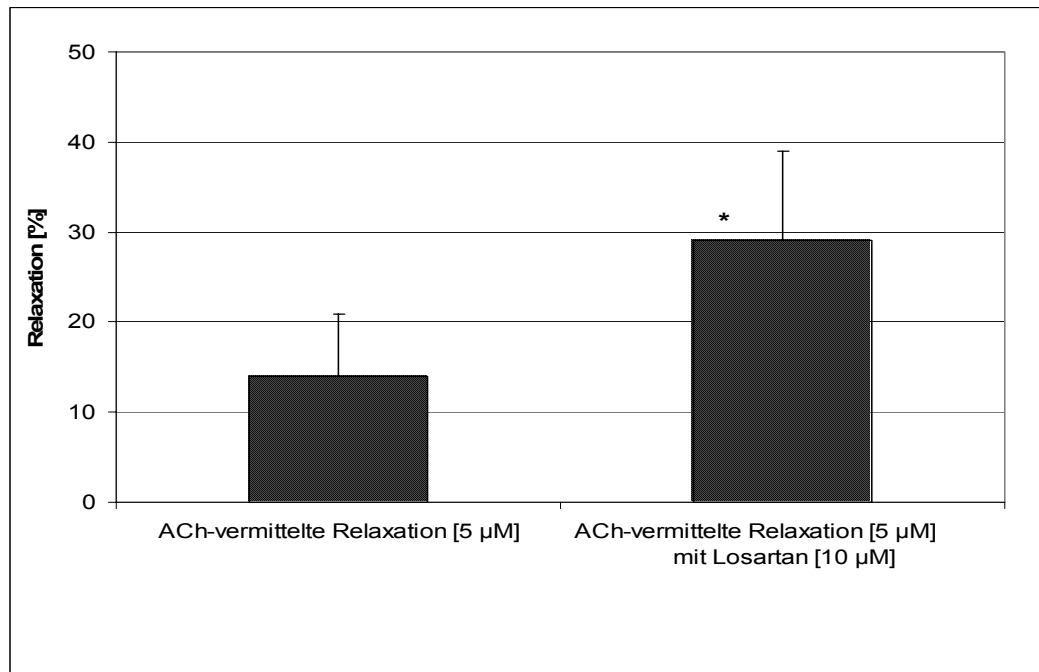


Abb. 29b: ACh-vermittelte Relaxation ohne und mit Losartan [10 µM] bei Hochdruckratten [n=7]. (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

Der Einsatz des AT_1 -Antagonisten Losartan [10 µM] brachte, wie in **Abb. 29a/b** gezeigt, eine signifikante Verbesserung der Endothel-abhängigen Vasorelaxation im Vergleich zur gemessenen Gesamtrelexation ohne Arzneistoff mit sich. Diese verbesserte Endothelfunktion war wieder bei beiden Tiergruppen zu beobachten. Auch hier war bei den Hochdruckratten die ACh-vermittelte Relaxation ohne Arzneistoff höher als bei den Standardtieren. Eine Schädigung des Endothels durch Bluthochdruck konnte nicht beobachtet werden.

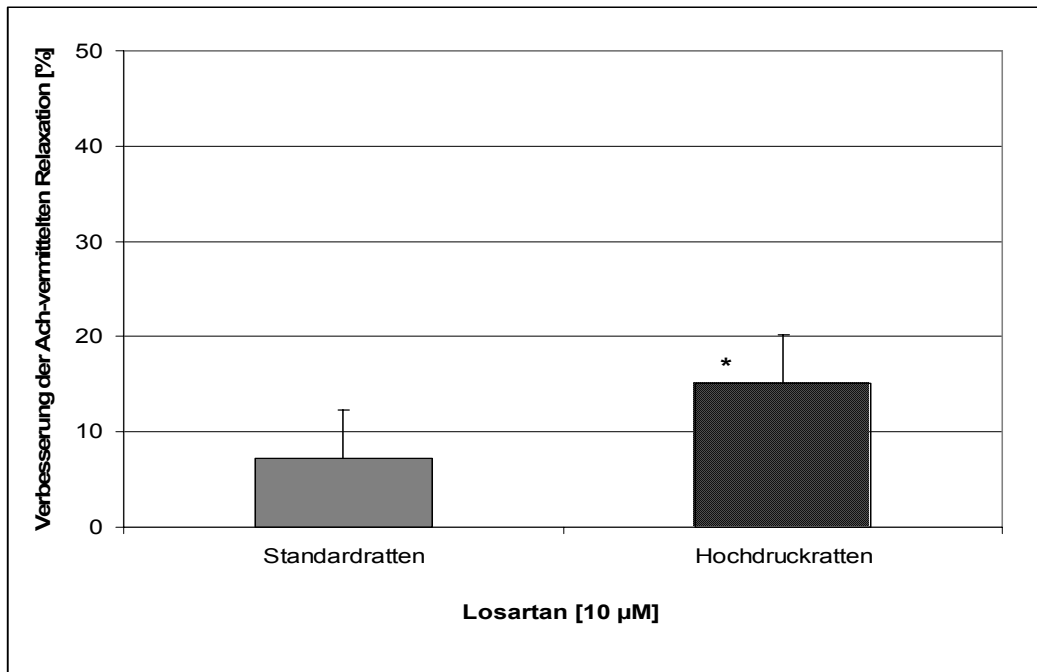


Abb. 30: Vergleich der Verbesserung der Endothelfunktion mit Losartan [10 mM] bei Standard- und Hochdruckratten. [n=6-7] (* signifikanter Unterschied, $p < 0,05$)

Der Betrag, um den sich die Endothelfunktion mit Losartan [10 μM] verbesserte, fiel für die Hochdrucktiere signifikant höher aus als für die Standardtiere (vgl. **Abb. 30**). Bei Tieren des Hypertoniemodells konnte Losartan folglich eine stärkere Verbesserung der Endothel-abhängigen Vasorelaxation erzielen als bei den gesunden Standardtieren.

4.4.2 Untersuchungen mit Aorta aus diabetischen Ratten

Es sollte die Endothelfunktion der diabetischen Ratten mit ACh [0,1 μM , 1 μM und 5 μM] gemäß **Abb. 2** untersucht werden. In **Abb. 31** sind die Ergebnisse zur Messung der Endothel-vermittelten Vasorelaxation der Diabetesratten dargestellt, zusätzlich wurden Aorten von 6-8 Wochen alten Standardtieren untersucht.

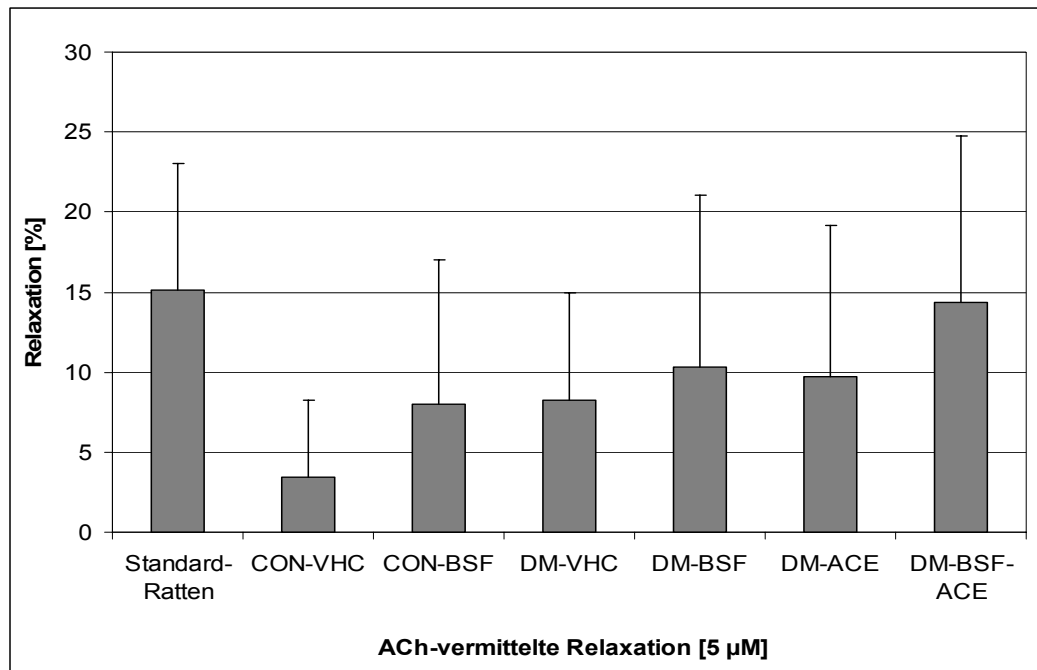


Abb. 31: Endothel-vermittelte Relaxation bei Ratten mit IDDM unter Behandlung mit Trandolapril und BSF. [n=5-9]

Abb. 31 zeigt, dass bei den diabetischen Ratten, die mit Trandolapril [0,3 mg/(kg*d)] und BSF [10 mg/(kg*d)] behandelt worden waren, die endotheliale Relaxation zwar tendenziell höher war als in den anderen Tiergruppen, diese Unterschiede jedoch nicht signifikant waren. Die Gesamtrelexation bei den Tieren der Diabetesstudie lag jeweils unter der der unbehandelten Standardratten, wobei zu berücksichtigen ist, dass jüngere Tiere generell eine bessere ACh-induzierte Relaxation aufweisen als ältere.

5 Diskussion

Die Beeinträchtigung des Organismus aufgrund von oxidativem Stress spielt bei vielen Krankheiten eine wesentliche Rolle. In der Pathophysiologie der Arterien, vor allem bei der Atherosklerose, stehen dabei oxidative Veränderungen der Gefäßwand, speziell der Endothel- und glatten Muskelzellen, sowie der Lipide im Vordergrund. Im Folgenden soll die Wirkung von oxidativem Stress auf die Radikalfreisetzung in der Gefäßwand, auf den Vasotonus und die Endothelfunktion diskutiert werden.

5.1 Wirkungen von oxidativem Stress auf Blutgefäße

5.1.1 Einfluss von Hydroperoxiden auf die Radikalbildung

Alle am Aufbau der Gefäßwand beteiligten Zellen sind in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies freizusetzen. Dafür stehen ihnen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. *Tabelle 3* zeigt eine allgemeine Übersicht, wo ROS in Blutgefäßen gebildet werden können und unter welchen physiologischen bzw. pathophysiologischen Situationen diese von Bedeutung sind (Heraldo et al. 2003).

Radikalquelle	Bildungsort	Bedeutung und Literaturstellen
Xanthinoxidase	Endothel	Ischämie-Reperfusion (Zweier et al. 1994) Hypercholesterinämie (White et al. 1996) Bluthochdruck (Suzuki et al. 1998, Mervaala et al. 2001)
eNOS	Endothel	Tetrahydrobiopterin-Mangel (Xia et al. 1998) Bluthochdruck (Kerr et al. 1999)
Atmungskette in Mitochondrien	Endothel Glatte Muskulatur Fibroblasten	Hyperoxie (Sanders et al. 1993) Diabetes (Nishikawa et al. 2000)
NAD(P)H-Oxidase der Gefäßwand	Endothel Glatte Muskulatur Fibroblasten	Physiologische O ₂ -Änderungen (Archer et al. 1999) Shear-Stress (De Keulenaer et al. 1998) AT II (Laursen et al. 1997)
Cyclooxygenase	Endothel	Zellproliferation (Brown et al. 1999)
Lipoxygenase	Glatte Muskulatur	Bildung von oxLDL (Hsieh et al. 2001))
Cytochrom P450-Reduktase	Endothel	Regulation des Gefäßmuskeltonus (Fleming et al. 2001)

Tab. 3: ROS-Quellen in der Gefäßwand (zitiert nach Herald et al. 2003).

Alle in **Tabelle 3** genannten Systeme tragen zur basalen Radikalbildung, die vor allem in der Sekretion von O₂^{•-} besteht, bei und können bei Stimulation oxidativen Stress verursachen. Görlach et al. (2000) untersuchten an Rattenaorten, welche Enzyme an der basalen Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in Blutgefäßen maßgeblich beteiligt sind. Als wichtigste enzymatische Quelle für die arterielle ROS-Bildung konnte die der in Leukozyten ähnlichen gp91phox-NADPH-Oxidase identifiziert werden. Dieses Enzym kommt vor allem in Endothelzellen vor, befindet sich dagegen kaum in glatten Muskelzellen, d.h. das Endothel ist wesentlich an der basalen ROS-Freisetzung in Blutgefäßen beteiligt.

Die Frage, inwieweit die Radikalproduktion der Gefäßwand durch exogen zugeführte Hydroperoxide stimuliert werden kann, ist Gegenstand dieser Arbeit. Da vergleichbare Publikationen nur in geringem Umfang vorliegen, soll ein kurzer Überblick über an anderen Geweben gewonnene Daten vorgestellt werden.

In den bisherigen Veröffentlichungen wurden sowohl H_2O_2 und *tert.*-BHP als auch enzymatisch gebildetes $\text{O}_2^{\cdot-}$ zur Stimulierung der Radikalbildung in verschiedenen Gewebetypen eingesetzt. Dabei wurde beobachtet, dass beide Hydroperoxide und ebenso enzymatisch freigesetztes $\text{O}_2^{\cdot-}$ in Rattenherz und -leber eine vermehrte Radikalfreisetzung induzierten (Gonzales et al. 1991). Auch an humanen Präparaten konnte mittels Chemilumineszenzmessung gezeigt werden, dass verschiedene Gewebe wie Herz, Leber oder Skelettmuskel vermehrt Radikale freisetzen, nachdem sie einem bei postischämischer Reperfusion auftretendem vergleichbaren oxidativen Stress ausgesetzt worden waren (Gonzales et al. 1991). Knoblauch et al. (1988) beobachteten eine durch *tert.*-BHP induzierte Chemilumineszenz in Kaninchenlunge, wobei als Mechanismus für die gesteigerte Radikalbildung die Interaktion des Peroxids mit den am Arachidonsäuremetabolismus beteiligten Enzymen Lipoxygenase und Cyclooxygenase diskutiert wurde. In Untersuchungen von Azorin et al. (1995) wurde ebenfalls *tert.*-BHP als Initiator zur Freisetzung von Radikalen in Rattenhirn eingesetzt. In dieser Studie konnte eine dosisabhängige prooxidative Wirkung aufgrund von *tert.*-BHP-induzierter Radikalfreisetzung beobachtet werden.

Nur wenige Messungen liegen darüber vor, ob die erwähnten Hydroperoxide auch in der Gefäßwand eine Radikalfreisetzung induzieren, obwohl bekannt ist, dass oxidativer Stress sowohl den Vasotonus als auch die Endothelfunktion von Blutgefäßen verändern kann (Cai et al. 2000). Bei Friedemann (2000) wurde

eine Beteiligung der glatten Muskelzellen (SMC) an der Radikalfreisetzung unter oxidativem Stress diskutiert, wie es schon für proliferierende SMC in Kultur gezeigt worden war (Heinle et al. 1993).

Die Chemilumineszenzmessungen mit Luminol im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass sowohl H_2O_2 als auch *tert.*-BHP die Radikalbildung in Blutgefäßen stimulieren und somit oxidativen Stress verstärken können. Dieser Effekt war dosisabhängig und konnte für alle untersuchten Gefäßpräparate (Rattenaorta, Arteria cerebri media vom Schwein, humane Plazentagefäße, humane Arteria mammaria) ermittelt werden. H_2O_2 setzte im Vergleich zu *tert.*-BHP in allen Gefäßtypen 100-1000fach mehr Radikale frei. In Rattenaorta wurde mit H_2O_2 [2mM] die höchste Menge an Radikalen freigesetzt. In Schweinehirnarterien, Plazentagefäßen und Arteria mammaria lag die maximal stimulierte Radikalmenge eine Zehnerpotenz unter der in Rattenaorta gemessenen Chemilumineszenz. Bei Plazentagefäßen trat ab H_2O_2 [0,5 mM], bei Arteria cerebri media ab H_2O_2 [1 mM] eine Sättigung der Radikalfreisetzung auf, welche dagegen weder bei Rattenaorta noch bei Arteria mammaria beobachtet werden konnte. Die mit *tert.*-BHP freigesetzte Radikalmenge wies in allen untersuchten Gefäßspezies Schwankungen der Chemilumineszenzwerte auf. Die erwähnte Dosisabhängigkeit der Messwerte war jedoch auch hier, insbesondere bei den Rattenaorten und den Arteria mammaria-Präparaten, zu erkennen.

Durch die Verwendung des spezifischen Lumineszenzindikators Lucigenin ergab sich, dass *tert.*-BHP vor allem die $O_2^{\cdot-}$ -Bildung stimulierte, während durch H_2O_2 darüber hinaus noch andere Radikalspezies generiert wurden. Eine Ursache für das größere Spektrum der durch H_2O_2 -induzierten Radikale kann die Tatsache sein, dass es, durch dessen Reaktion mit Übergangsmetallen, z.B. Fe^{2+} oder $O_2^{\cdot-}$ selbst, zu einer Bildung von dem sehr reaktionsfähigen OH^{\cdot} -

Radikal (Fenton-Reaktion) kommt, so dass weitere Reaktionspartner für die Radikalfreisetzung gebildet werden. Zusätzlich könnte die erhöhte Radikalbildung durch H_2O_2 von dessen niedrigerem Molekulargewicht und der daraus resultierenden erhöhten Diffusionsfähigkeit herrühren (vgl. Heinle et al. 1988). Ob die Peroxid-stimulierte Radikalbildung vermehrt im Endothel oder in den glatten Muskelzellen stattfindet, muss durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

Die Unterschiede der durch H_2O_2 - und *tert.*-BHP-induzierten Radikalbildung sind wichtig für die Interpretation der Peroxideffekte auf die vaskuläre Funktion, die als nächstes besprochen werden.

5.1.2 Einfluss von Hydroperoxiden auf den Vasotonus

In der Literatur wurden bisher dualistische Effekte von Peroxiden auf den Vasotonus beschrieben. Es konnte durch ROS ausgelöst, je nach Gefäßart bzw. Art des oxidativen Stresses, entweder eine Vasokonstriktion oder -dilatation beobachtet werden. Bei diesen Ereignissen sind vor allem die Peroxideffekte auf die glatte Muskulatur sowie auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel von zentraler Bedeutung, weshalb diese beiden Parameter im Folgenden näher betrachtet werden.

5.1.2.1 Einfluss von Hydroperoxiden auf die glatte Muskulatur

Rubanyi et al. beschrieben 1988 den Einfluss von Hydroperoxiden auf den Vasotonus von Kaninchencarotis und Rattenschwanzarterien. Freie, durch Wirkung von elektrischem Strom im Medium generierte Sauerstoffradikale

lösten hier abhängig von der Radikal- bzw. Gefäßspezies entweder Vasodilatation oder Vasokonstriktion aus. Die unterschiedliche Beeinflussung des Kontraktionszustandes der Blutgefäße führte Rubanyi auf die gegensätzlichen Effekte der verschiedenen ROS-Spezies zurück: $O_2^{\cdot-}$ sollte einerseits durch den oxidativen Abbau von Noradrenalin den Vasotonus senken, wohingegen dessen Wechselwirkung mit NO (siehe **5.1.3**) zu einer Reduktion der Endothel-abhängigen Relaxation führte. H_2O_2 und das Hydroxylradikal sollten dagegen direkt relaxierend auf die glatte Muskulatur wirken und darüber hinaus die Synthese und Freisetzung des EDRF stimulieren.

Gegensätzliche Wirkungen von H_2O_2 beschrieb auch Wolin (1991). Dieser Autor diskutierte als Mechanismus die Stimulierung der Prostaglandin-Synthese, da durch Peroxide das zu deren Freisetzung notwendige Enzym Cyclooxygenase aktiviert wurde. Je nachdem, welches Prostaglandin an welcher Stelle im Gefäßbett freigesetzt worden war, kam es zur Vasodilatation oder -konstriktion. Als Erklärung des dilatierenden Effekts erwähnte Wolin außerdem eine mögliche Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch beim Abbau von Peroxiden mit dem Enzym Katalase entstehende Intermediate. Diese Enzymaktivierung erfolgte über die oxidierte Form des Enzyms Katalase, auch Compound I genannt (Burke und Wolin 1987). Superoxidanionen sollten Vasorelaxation verhindern (Cherry et al. 1990), bedingt durch Hemmung der sGC-Aktivierung (Burke und Wolin 1987). Die durch H_2O_2 induzierte Vasorelaxation könnte folglich durch $O_2^{\cdot-}$ gehemmt werden (Wolin 1991). Lounsbury et al. (2000) beschrieben dualistische Wirkungen von ROS auf den Gefäßmuskeltonus, die nicht nur abhängig von der Art der untersuchten Gefäßspezies sondern auch von der Konzentration der applizierten Radikale sowie der Beschaffenheit des Endothels waren.

In den bisherigen Studien wurden den Superoxidanionen meistens vasokonstriktorische Eigenschaften zugeschrieben. Dies könnte einerseits durch die bereits erwähnte Beseitigung von NO unter Bildung von Peroxynitrit oder andererseits durch die direkte Wirkung dieser ROS-Spezies auf glatte Muskelzellen erklärt werden (Rubanyi und Vanhouette 1986). Lediglich in Hirngefäßen bewirkte $O_2^{\cdot-}$ Vasodilatation (Wei et al. 1996).

Für H_2O_2 wurde bei Bharadwaj und Prasad (1995) im Versuch mit Kaninchencarotiden in niedrigen Konzentrationen vasokonstriktorische Eigenschaften beschrieben, im hohen Konzentrationsbereich fand dagegen zunächst eine NO-vermittelte Relaxation statt, der eine Kontraktion folgte. In Hirngefäßen (Wei et al. 1996) und Schweinekoronargefäßen (Barlow und White 1998) wirkte H_2O_2 dann relaxierend, wenn die Blutgefäße mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ oder Histamin vorkontrahiert worden waren. Bei Koronargefäßen vom Schwein, bei denen eine Kontraktion mit 80 mM KCl ausgelöst worden war, war H_2O_2 nicht in der Lage eine Relaxation herbeizuführen.

Dagegen wurde bei Untersuchungen an Kaninchencarotiden von Heinle et al. (1988) gefunden, dass durch die Hydroperoxide H_2O_2 und *tert.*-BHP [$> 0,2$ mM] ausschließlich Kontraktion ausgelöst wurde. Die Carotiden befanden sich vor der Behandlung mit dem Peroxid nicht in vorkontrahiertem Zustand, d.h. die Zunahme des Vasotonus konnte ausschließlich auf die Peroxidzugabe zurückgeführt werden. Bei diesen Versuchen erwies sich die kontrahierende Wirkung des H_2O_2 effizienter als die des *tert.*-BHP, vermutlich weil dieses aufgrund des niedrigeren Molekulargewichtes besser diffusionsfähig ist. Da die Peroxid-induzierte Kontraktion der Carotissegmente auch in Ca^{2+} -freier Lösung stattfand, konnte angenommen werden, dass diese durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ausgelöst wurde. Der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel im Zellinneren aktivierte die Myosinleichtkettenkinase, welche nach

Phosphorylierung die Querbrückenbildung zwischen Actin und Myosin ermöglichte (Gagelmann et al. 1984, Kamm und Stull 1985). Als möglicher Mechanismus der Peroxid-induzierten Kontraktion wurde in dieser Arbeit weiterhin eine Oxidation von Thiolgruppen durch die applizierten Peroxide diskutiert. Arbeiten von Lötscher et al. (1979) und Orrenius et al. (1983) zeigten, dass Mitochondrien und das endoplasmatische Reticulum (Trimm et al. 1986) durch Oxidation von Thiolgruppen (in Mitochondrien von Nicotinamidnucleotiden) Ca^{2+} freisetzten und somit in der glatten Muskulatur Kontraktion auslösten. In einer weiteren Arbeit von Heinle et al. (1989) wurde an Rattenaorten und Kaninchencarotiden beobachtet, dass H_2O_2 die durch KCl-Depolarisation ausgelöste arterielle Kontraktion förderte und sowohl zu einer stärkeren Kraftentwicklung als auch zu einer langsameren Relaxation führte. In Konzentrationen [$<0,2$ mM] löste H_2O_2 alleine zwar keine Kontraktion aus, konnte aber die durch andere Agonisten ausgelöste Kontraktion potenzieren. Als Mechanismus für die erhöhte Kontraktionskraft wurde auch hier eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern verbunden mit einer Hemmung der Dephosphorylierung der leichten Ketten des Myosin diskutiert. Die verlängerte Relaxationszeit hingegen wurde auf eine Peroxid-induzierte Hemmung des Ca^{2+} -Rücktransports, ähnlich wie im Myocard beobachtet worden war (Meerson et al. 1982), zurückgeführt.

Vasokonstriktorische Wirkungen von H_2O_2 wurden auch von Yang et al. (1998) an Rattenaorten beobachtet. Die Messungen wurden an intakten bzw. deendothelialisierten Aortensegmenten durchgeführt. Im Konzentrationsbereich von [$5 \mu\text{M}$ - 5 mM] konnte sowohl mit als auch ohne Endothel eine konzentrationsabhängige Kontraktionssteigerung beobachtet werden. Dabei waren die Kontraktionen bei den Aortensegmenten ohne Endothel stärker als bei denen mit Endothel, in beiden Fällen wirkte der Zusatz von Katalase 1200 U/ml hemmend. Weitere Untersuchungen ergaben, dass bei der Auslösung der Kontraktion durch

H_2O_2 neben Ca^{2+} auch Hydroxylradikale, Cyclooxygenase-Produkte, Protein-kinase C sowie die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung eine Rolle spielten. Ein nicht identifizierter Mediator, der durch den Cytochrom P450-Inhibitor (Proadifen) unter Einfluss von H_2O_2 freigesetzt wurde, schien für die Kontraktion der glatten Muskulatur der Rattenaortensegmente *in vitro* ebenfalls eine Rolle zu spielen (Yang et al. 1998).

Die bisher aufgezeigten Reaktionsmechanismen machen deutlich, wie komplex die Wirkungen von Peroxiden auf den Tonus der arteriellen Gefäßwand sind. Da einer Vasokonstriktion eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in den glatten Muskelzellen vorausgeht, soll dieser Effekt von oxidativem Stress auf die Ca^{2+} -vermittelten Signalsysteme in SMC noch ausführlicher beschrieben werden.

5.1.2.2 Einfluss von Hydroperoxiden auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase in glatten Muskelzellen

Roveri et al. untersuchten 1992 den Effekt von H_2O_2 auf den Ca^{2+} -Spiegel in glatten Muskelzellen. Die Applikation von H_2O_2 [300 μM] löste in diesen Zellen zunächst einen raschen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aus, welche anschließend wieder abfiel und sich auf ein neues Level einpendelte, das höher lag als vor der Peroxidbehandlung. Nach Inkubation mit Ca^{2+} -freiem Medium konnte der anfänglich rasche Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels zwar immer noch beobachtet werden, das Einpendeln auf einen höheren Ca^{2+} -Grundspiegel blieb jedoch aus. Um die Beteiligung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher besser einschätzen zu können, wurden die Muskelzellen mit Vasopressin behandelt, das in der Lage ist, Ca^{2+} aus IP_3 (Inositoltriphosphat)-sensitiven Speichern freizusetzen. Nach Behandlung der Zellen mit Vasopressin blieb aufgrund der

bereits freigesetzten Ca^{2+} -Ionen der initiale Ca^{2+} -Anstieg aus, was darauf hindeutete, dass dieser aus intrazellulären Speichern herrührte. Weitere Untersuchungen mit den Disulfid-reduzierenden Agenzien Dithiothreitol (DTT) oder Dithioerythritol (DTE) zeigten, dass das Einpendeln auf einen höheren intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel nach der Peroxidbehandlung durch einen Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum bedingt war und mit der Oxidation von Membran-gebundenen Thiolgruppen zusammenhing.

Loundsbury et al. (2000) beschrieben den Einfluss von ROS auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in glatten Muskelzellen, wobei sie die Inaktivierung der SERCA-Pumpen (sarco(endo)plasmatic reticulum Ca^{2+} -transporting ATPase) durch ROS in den Vordergrund stellten. Diese Pumpen befördern Ca^{2+} -Ionen gegen den Konzentrationsgradienten ins Lumen des SR (sarkoplasmatisches Reticulum). Sowohl für O_2^- als auch für H_2O_2 konnte eine Beeinträchtigung der SERCA-Pumpen gezeigt werden (Grover et al. 1992). Das Superoxidanionen-produzierende System Xanthin/XOD übte darüber hinaus einen inaktivierenden Effekt auf Plasmamembran-gebundene Ca^{2+} -Pumpen aus (Grover und Samson 1988). Die Hemmung der SERCA-Pumpen könnte möglicherweise auf der irreversiblen Oxidation von Sulfhydrylgruppen beruhen oder durch direkten Angriff der ATP-bindenden Stelle erfolgen (Suzuki et al. 1991). Einen unterschiedlichen Effekt zeigten Peroxide und O_2^- in Bezug auf IP_3 -sensitive Speicher. Während Peroxide sowohl die Wiederaufnahme in IP_3 -sensitive als auch in IP_3 -nicht-sensitive Speicher verhinderten, wirkte sich O_2^- lediglich hemmend auf die Ca^{2+} -Aufnahme in IP_3 -sensitive Speicher aus (Elmoselhi et al. 1996). Die beschriebene Beeinträchtigung des Ca^{2+} -Rücktransportes aus der glatten Muskelzelle bzw. in deren intrazelluläre Speicher führte zu dem bereits erwähnten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.

5.1.2.3 Eigene Befunde

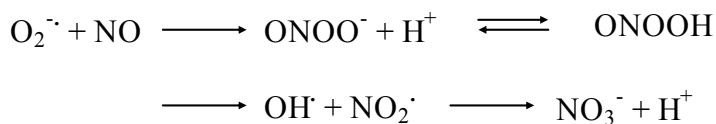
In dieser Arbeit konnte der vasokonstriktorische Effekt sowohl von $O_2^{\cdot-}$ (KO_2) als auch der Hydroperoxide H_2O_2 und *tert.*-BHP gezeigt werden. Die Zugabe der Peroxide erfolgte bei allen Messungen auf vorkontrahierte Gefäßpräparate, so dass eine Parallelität des Reaktionsverhaltens der verschiedenen Spezies beobachtet werden konnte. Um eine verminderte biologische Aktivität aufgrund oxidativer Veränderungen von vasokonstriktorisch wirkenden Agonisten zu verhindern, erfolgte die Kontraktionsauslösung - mit Ausnahme der Schweinehirngefäße - vor der jeweiligen Peroxid- bzw. KO_2 -Zugabe mit 30 mM KCl. Die am Kontraktionsplateau zugegebenen Hydroperoxide bewirkten bei sämtlichen untersuchten Spezies (Rattenaorta, Kaninchencarotis, humanen Plazentagefäßen) eine Kontraktionskraftsteigerung. Für Rattenaorta war diese Kraftsteigerung dosisabhängig, wobei ab [1 mM] Sättigung auftrat. Außerdem war hier, entsprechend den Messungen an Kaninchencarotiden bei Heinle et al. (1988), die kontraktionskraftsteigernde Wirkung von H_2O_2 höher als die des *tert.*-BHP. Noch effizienter erwies sich das aus KO_2 freigesetzte $O_2^{\cdot-}$. Bei Schweinehirngefäßen wurde Serotonin als Kontraktionsstimulus eingesetzt. Auch hier löste die Peroxidzugabe eine Zunahme der Kontraktionskraft aus, wobei die durch H_2O_2 erzielte Wirkung größer war als für *tert.*-BHP. Im Gegensatz dazu rief bei Plazentagefäßen *tert.*-BHP eine wesentlich höhere Kraftzunahme hervor als H_2O_2 . Bei den orientierenden Messungen an Kaninchencarotiden konnte kein Unterschied der kontraktionskraftsteigernden Wirkung für die Hydroperoxide beobachtet werden.

Bei dem vorliegenden Versuchsansatz wirkten folglich alle eingesetzten ROS-bildenden Systeme kontraktionskraftsteigernd. Dieses einheitliche Reaktionsmuster ist erstaunlich, wenn man die bisher beschriebenen

verschiedenartigen Wirkungen von ROS auf den Vasotonus bedenkt, doch erklärbar durch den Ca^{2+} -erhöhenden Effekt in SMC.

5.1.3 Einfluss von Hydroperoxiden auf die Endothelfunktion

Aus dem Gefäßendothel können Radikale freigesetzt werden, die den Vasotonus beeinflussen. Dazu gehören NO, $\text{O}_2^{\cdot-}$ sowie H_2O_2 (Arroyo et al. 1990, Babbs et al. 1991, Moncada et al. 1991, Sundqvist 1991). NO wirkt generell relaxierend, während $\text{O}_2^{\cdot-}$ sowohl kontrahierende als auch relaxierende Effekte aufweist. Insgesamt hat die Reaktion dieser beiden Radikale zum Peroxynitrit (siehe folgende Gleichung) jedoch immer eine verminderte Bioverfügbarkeit des Vasorelaxans NO zur Folge:



Reaktionsgleichung zur Peroxynitritbildung aus NO und $\text{O}_2^{\cdot-}$ sowie dessen Zerfall (Weiterreaktion zu Nitrat).

Peroxynitrit weist bei pH 7,4 eine Halbwertszeit von 1,9 s auf und zerfällt, gemäß oben stehender Gleichung, nach Protonierung zu OH^\cdot und NO_2^\cdot . Die Reaktionsgeschwindigkeit zur anschließenden Bildung von Salpetersäure (HNO_3) ist niedriger als die meisten Oxidationsreaktionen des OH^\cdot (Beckmann et al. 1990). Da $\text{O}_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 im Vergleich zum Hydroxylradikal eine geringere chemische Wirksamkeit aufweisen, kommt der Bildung des reaktiveren OH^\cdot eine besondere Bedeutung in Bezug auf dessen zelltoxische Wirkungen zu (Halliwell et al. 1993).

Bei verschiedenen Kreislaufkrankungen wie z.B. arterielle Hypertonie oder Atherosklerose wurde die beeinträchtigte Endothel-abhängige Vasodilatation mit einer erhöhten Produktion von ROS in Zusammenhang gebracht (Ohara et al. 1993, Keaney et al. 1995, Cai und Harrison 2000, Ulker et al. 2003). Da ROS die physiologischen Reaktionen in den Endothelzellen in vielfacher Weise verändern können, soll deren Einfluss auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel, die NO-Synthase sowie die endotheliale Relaxation genauer diskutiert werden.

5.1.3.1 Einfluss von Hydroperoxiden auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel im Endothel

ROS lösen in Endothelzellen, ähnlich wie in der glatten Muskulatur, einen Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels aus. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl *tert.*-BHP als auch H_2O_2 zur Simulation von oxidativem Stress verwendet, weshalb die bisher bekannten Effekte derselben auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in Endothelzellen hier kurz dargestellt werden sollen.

Hu et al. (1998) beobachteten bei Messungen an humanen Endothelzellen, dass H_2O_2 ab Konzentrationen von $[100 \mu\text{M}]$ Oszillationen des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels induzierte. Diese Schwankungen wurden durch eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern, nämlich dem endoplasmatischen Retikulum, hervorgerufen. Dagegen waren bei Bowles et al. (2001) am H_2O_2 -induzierten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in Endothelzellen aus Koronararterien vom Schwein Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellularraum beteiligt. Das Vasorelaxans Bradykinin, das wie ACh die Endothel-abhängige Relaxation stimuliert, hatte hier keinen Einfluss auf die Veränderungen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, d.h. dieser Mechanismus war Agonist-unabhängig. Eine weitere Erklärung für die Öffnung

von Ca^{2+} -Kanälen durch H_2O_2 beschrieben Bychkov et al. (1999). Hier konnte eine H_2O_2 -bedingte Depolarisation von Endothelzellen gemessen werden, die möglicherweise zur Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen in der Zellmembran führen kann.

Das Hydroperoxid *tert.*-BHP induziert ebenfalls eine Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dies wurde z.B. von Elliott et al. (1989) untersucht, wobei der Einfluss von *tert.*-BHP auf die Agonist-induzierten Veränderungen des Calciumspiegels in Endothelzellen betrachtet wurde. Kultivierte humane Endothelzellen wurden in einer Zeitspanne von 0-180 min mit *tert.*-BHP [0,4 mM] inkubiert und die durch Bradykinin ausgelösten Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels beobachtet. Während einer Inkubationszeit von bis zu 30 min nahm der Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Anstieg in der Endothelzelle ab, wobei der Ca^{2+} -Influx aus dem Extrazellulärraum verhindert, die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern dagegen nur wenig verändert worden war. Nach einer Inkubationszeit über 60 min nahm die basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stark zu, der Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Anstieg ging dagegen stark zurück. Durch *tert.*-BHP wurde folglich der Mechanismus der Endothel-abhängigen Vasorelaxation verändert. In einer Studie von 1993 konnten Elliott et al. eine Hemmung des Ca^{2+} -Influx in Endothelzellen aus intrazellulären Speichern durch *tert.*-BHP beobachten. Das Ausmaß dieses Effektes war abhängig von der Verfügbarkeit von intrazellulärem Glutathion. Erhöhte Konzentrationen von oxidiertem Glutathion (GSSG) konnten den hemmenden Effekt von *tert.*-BHP auf die Endothel-abhängige Relaxation potenzieren (Elliott et al. 1995, Henschke et al. 1995).

5.1.3.2 Einfluss von Hydroperoxiden auf die endotheliale NO-Synthase

Da für die Endothel-abhängige Vasorelaxation die Bioverfügbarkeit von NO entscheidend ist, muss auch der Einfluss von Hydroperoxiden auf die NOS betrachtet werden. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass H_2O_2 die Aktivität der eNOS stimulieren konnte, wobei dieser Effekt calciumabhängig war (Degnim et al. 1998). Des Weiteren ermittelten Cai et al. (2001) H_2O_2 als einen wirksamen Stimulus der eNOS-Genexpression, wobei auch dieser Effekt über einen calciumabhängigen Mechanismus vermittelt wurde.

Thomas et al. (2002) beobachteten an Endothelzellen von Schweineaorta, dass durch H_2O_2 [80-480 μM] die calciumabhängige Aktivität der eNOS durch Veränderung des Phosphorylierungsstatus erhöht wurde. Dies könnte einen Mechanismus der Endothelzellen darstellen, unter oxidativem Stress die Verfügbarkeit des NO aufrechtzuerhalten. Des Weiteren wurde in dieser Studie beobachtet, dass H_2O_2 [0,25 mM] auf mit Phenylephrin vorkontrahierte Kaninchenaortenringe eine relaxierende Wirkung hatte. Da dieser Effekt mit dem NOS-Inhibitor L-NAME signifikant gehemmt wurde, kann auch hier auf eine Erhöhung der NOS-Aktivität durch H_2O_2 geschlossen werden.

Der oben aufgezeigte Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion lässt vermuten, dass ROS ausschließlich schädigende Eigenschaften auf die Endothelfunktion der Blutgefäße haben. Dieser Hypothese entsprechend beobachteten z.B. Rey et al. (2002), dass endogen, mittels der gp91(phox) NAD(P)H-Oxidase freigesetztes O_2^- zu einer Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen Relaxation führte. Im Gegensatz dazu stehen die beschriebenen Mechanismen, bei denen die applizierten Peroxide die NO-Freisetzung in Endothelzellen stimulierten. Bei Studien von Alam et al. (1998) sowie Walia et al. (2000) wurde die Endothel-vermittelte Relaxation durch

Applikation von ROS beispielsweise nicht beeinträchtigt. Alam et al. untersuchten den Einfluss von OH^\cdot auf die Bradykinin-induzierte Relaxation von Schweinekoronararterien. Die Vorbehandlung der Gefäßpräparate mit OH^\cdot konnte den Gesamtwert der Relaxation nicht beeinträchtigen. Von Walia et al. wurde die Wirkung von H_2O_2 [0-0,5 mM] auf die A23187-induzierte Relaxation von Schweinekoronararterien gemessen. A23187 [10 μM] bewirkt eine Endothel-abhängige Relaxation in vorkontrahierten Arterien (Rapoport et al. 1983). Die Vorbehandlung der Arterien mit H_2O_2 [0-0,5 mM] konnte die Endothel-abhängige Relaxation ebenfalls nicht signifikant beeinflussen.

Cosentino et al. (2001) zeigten die Schlüsselfunktion des Tetrahydrobiopterins (H_4B) für die Funktionsfähigkeit der eNOS. H_4B ist als Cofaktor der eNOS für deren katalytische Aktivität von wesentlicher Bedeutung. Transgene Mäuse, bei denen die H_4B -Konzentration um 60% reduziert war, wiesen eine verminderte NO-Freisetzung zugunsten einer Erhöhung der H_2O_2 -Produktion durch die eNOS auf. Der H_4B -Mangel führte folglich zu einer Dysfunktion der eNOS verbunden mit der Bildung von ROS als Mediatoren der Endothel-abhängigen Relaxation (vgl. Van Hinsberg et al. 2001). Shimizu et al. (2003) zeigten, dass H_2O_2 die H_4B -Synthese aktiviert und dass dies eine erhöhte NO-Freisetzung durch Koinduktion der iNOS zur Folge hatte. H_2O_2 scheint folglich ein wesentliches Signalmolekül zur Regulation der NOS in Endothelzellen zu sein.

5.1.3.3 Eigene Befunde

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Akuteffekte von ROS auf die Endothel-abhängige Relaxation ermittelt. Die beobachteten Effekte waren abhängig von den eingesetzten Peroxiden sowie von der untersuchten Gefäßspezies.

Für Rattenaorten wurde für die Hydroperoxide H_2O_2 und *tert.*-BHP eine duale Wirkung auf die Endothelfunktion beobachtet. In niedriger Konzentration, d.h. H_2O_2 [0,03-1 mM] bzw. *tert.*-BHP [0,05-0,125 mM] wurde diese durch die Peroxide verbessert. Grund hierfür könnte der durch H_2O_2 bzw. *tert.*-BHP ausgelöste Anstieg von Ca^{2+} in den Endothelzellen sein (Elliott et al. 1989, Hu et al. 1998), der die Aktivierung der eNOS zur Folge hat (Shimizu et al. 1998, Cai et al. 2001, Thomas et al. 2002). Eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion wurde für die höheren Konzentrationen von H_2O_2 und *tert.*-BHP gefunden, so dass es zumindest in dieser Situation zur oxidativen Schädigung des Endothels kam.

Die orientierenden Messungen an Kaninchencarotiden zeigten ebenfalls eine Verbesserung der ACh-vermittelten Relaxation unter Einfluss von niedrigen Peroxidkonzentrationen, d.h. H_2O_2 [0,5 mM] bzw. *tert.*-BHP [0,5 mM]. Hier fand sogar mit H_2O_2 [2 mM] keine Schädigung des Endothels statt, mit *tert.*-BHP in derselben Konzentration konnte dagegen keine Endothelfunktion mehr gemessen werden.

Offensichtlich ist die schädigende Wirkung auf das Endothel für *tert.*-BHP bei Rattenaorten und Kaninchencarotiden weitaus höher als dies für H_2O_2 der Fall ist. Obwohl *tert.*-BHP, wie unter 5.1.1 gezeigt, insgesamt weniger Radikale im Gefäßgewebe freisetzt als H_2O_2 , vermag es in niedrigerer Dosis die Endothel-

vermittelte Relaxation zu beeinträchtigen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass *tert.*-BHP ausschließlich durch das Enzym Glutathionperoxidase abgebaut wird und damit über das Glutathionsystem in den Thiol/Proteinthiol-Redoxstatus der Zelle eingreifen kann. H_2O_2 wird zusätzlich durch Katalase metabolisiert, so dass der oxidative Effekt auf Thiole geringer sein könnte. Der Einfluss von *tert.*-BHP auf die Gefäßwand, im Besonderen auf das Endothel, könnte daher von längerer Dauer sein als bei H_2O_2 . Betrachtet man die Rolle der Superoxidanionen bei der Schädigung des Endothels, so ist diese offensichtlich nicht so relevant, da in der Gefäßwand, wie oben gezeigt, durch beide Peroxide ähnlich viel $\text{O}_2^{\cdot-}$ freigesetzt werden.

Bei Schweinehirnarterien wurde sowohl mit H_2O_2 [0,25 mM] als auch mit *tert.*-BHP [0,25 mM] die Endothelfunktion vermindert. Hier wies H_2O_2 eine größere schädigende Wirkung auf als *tert.*-BHP. Offensichtlich reagierten Hirngefäße empfindlicher auf die Applikation der Peroxide als die untersuchten Rattenaorten und Kaninchencarotiden.

Der Einfluss von $\text{O}_2^{\cdot-}$ auf die Endothelfunktion wurde an Ringpräparaten aus Rattenaorta gemessen. Auffällig war hier, dass sowohl beim Einsatz von KO_2 als auch von Xanthin/XOD eigentlich widersprüchliche Effekte dieser Spezies beobachtet wurden. Bei Applikation derselben $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Konzentration trat entweder eine deutliche Verbesserung der Endothelfunktion auf oder aber es war keine ACh-vermittelte Relaxation mehr messbar. Für diesen Befund gibt es keine plausible Erklärung. Möglicherweise spielt die vorhandene H_4B -Konzentration der Endothelzellen eine wichtige Rolle, so dass in Abhängigkeit dieses Cofaktors die Reaktion der Endothelzellen unterschiedlich ausfällt. (vgl. Cosentino et al. 2001).

5.1.4 Langfristiger Einfluss von oxidativem Stress auf Blutgefäße

Neuere Befunde zeigen, dass ROS direkt an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt sind, so dass diese nicht nur als schädigende Agenzien sondern auch als physiologische Signalmoleküle zu betrachten sind. Ein allgemeines Schema, das die Ca^{2+} - bzw. ROS-abhängigen Signalwege anzeigt, ist in *Abb. 32* dargestellt. Man erkennt, dass z.B. der für pathophysiologische Vorgänge des Bluthochdrucks wichtige Agonist AT II, aber auch mechanische Reize auf die Gefäßwände über G-Protein-gekoppelte Reaktionen sowohl das intrazelluläre Ca^{2+} erhöhen als auch die NADPH-Oxidase stimulieren können. Die Radikalfreisetzung innerhalb und außerhalb der Zellen führt folglich sowohl zur Aktivierung bestimmter Signalwege als auch zur Induktion Redox-empfindlicher Gene. ROS bewirken verschiedene physiologische Veränderungen im Gewebe von Blutgefäßen, die mit Wachstum der glatten Muskulatur, Entzündungsreaktionen und Beeinträchtigung der Endothel-vermittelten Vasorelaxation einhergehen können. Nehmen diese Folgereaktionen zu große Ausmaße an, kommt es zu pathologischen Reaktionen wie Bluthochdruck, endotheliale Dysfunktion oder Atherosklerose (Griendling et al. 2000).

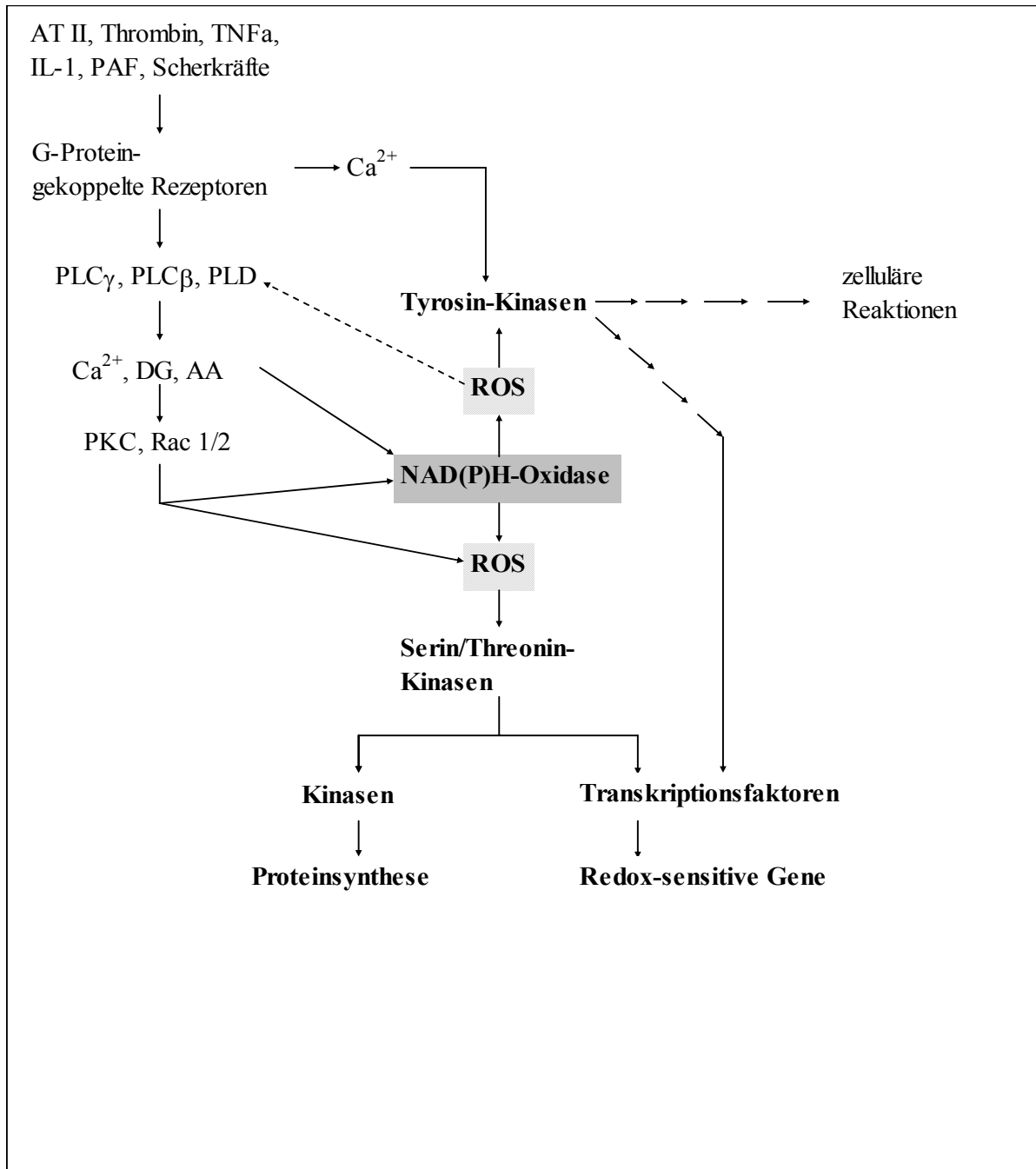


Abb. 32: Vereinfachte Darstellung Redox-sensitiver Signalwege in Zellen von Blutgefäßen. Wege mit gestrichelter Linie sind noch nicht vollständig nachgewiesen (nach Griendling et al. 2000). [PAF – Plättchen aktivierender Faktor; PLC, PLD – Phospholipase C und D; DG – Diacylglycerol; AA – Arachidonsäure; PKC – Proteinkinase C]

5.2 Endotheliale Dysfunktion bei arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus

5.2.1 Arterielle Hypertonie

Verschiedene Studien mit Patienten, die an essentieller Hypertonie leiden, zeigten, dass diese eine verminderte Endothel-vermittelte Relaxation aufwiesen. Da die Applikation des NOS-Inhibitors L-NMMA (N^G-Monomethyl-L-Arginin) bei essentieller Hypertonie keinen wesentlichen Einfluss auf die Endothelfunktion hatte, liegt hier offensichtlich eine verminderte Bioverfügbarkeit des NO vor. Untersuchungen der Nitratkonzentration im Urin von Patienten mit essentieller Hypertonie zeigten, dass sowohl der Nitrat-Plasma-Spiegel als auch die cGMP-Ausscheidung im Vergleich zu den gesunden Probanden niedriger waren (Bragulat et al. 2001). Durch die verminderte endotheliale Freisetzung des NO sowie die erhöhte Produktion von kontrahierenden Substanzen wie AT II oder Endothelin 1 (ET 1), kommt es zu einer Betonung der Vasokonstriktoren gegenüber den Vasodilatoren (Van-houette 1989, Rubanyi 1993, Cardillo et al. 2002). Je nach untersuchtem Hypertoniemodell weist die endotheliale Dysfunktion unterschiedliche Merkmale auf. Bei Dahl-Salz-empfindlichen Ratten ist die Endothel-abhängige Relaxation mit einer verminderten Aktivität der konstitutiv vorhandenen NOS, der Induktion von endogenen NOS-Inhibitoren sowie einer reduzierten Empfindlichkeit der SMC für NO verbunden. Dagegen liegt bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) zwar eine erhöhte NOS-Expression und -Aktivität vor, die endotheliale Relaxation ist aber dennoch entweder unverändert oder vermindert (Boulanger 1999). Auch hier wurde eine verminderte Sensibilität der SMC für NO beobachtet, was Soloviev et al. (1998) hauptsächlich auf eine Erhöhung der PKC-Aktivität zurückführten. Bei manchen Hypertonieformen ist außerdem eine erhöhte Freisetzung von Endoperoxiden (Cordellini 1999) oder Superoxidanionen (Boulanger 1999,

Zalba et al. 2001) an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt. De Wit et al. (2003) untersuchten die Veränderung der Gap-junction-bildenden Connexine unter Bluthochdruck. Über Gap-junctions werden Reaktionen der einzelnen Zellen in den Arteriolen koordiniert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass arterielle Hypertension mit einer verminderten Konzentration des Connexins Cx40 verbunden ist.

Die bei arterieller Hypertonie auftretende endotheliale Dysfunktion kann also ganz unterschiedliche Ursachen haben und ist daher auch auf verschiedenen Wegen beeinflussbar. Ob eine Therapie mit Antihypertensiva auch Einfluss auf die verminderte endotheliale Relaxation nehmen kann, wurde in der Literatur kontrovers diskutiert (Panza et al. 1993). In zahlreichen Studien wurde jedoch gezeigt, dass bei der Therapie mit Antihypertonika die Endothel-abhängige Relaxation verbessert werden konnte. Eine Zusammenstellung von Arzneistoffen, bei denen ein positiver Effekt auf die Endothelfunktion beobachtet wurde, zeigt **Tabelle 5**.

Arzneistoffklasse	Substanz	Referenzartikel
ACE-Hemmer	Cilazapril	Rubanyi et al. (1993)
	Captopril	Hirooka et al. (1992)
	Enalapril	Nunes et al. (2000)
AT ₁ -Antagonisten	Candesartan	Ghiadoni Et al. (2000)
	Losartan	Maeso et al. (1999)
	Valsartan	Klingbeil et al. (2003)
β-Blocker + Diuretikum	Nebivolol + Bendrofluazid	Tzemos et al. (2001)
Calcium-Antagonisten	Nifedipin	Taddei et al. (2001)
	Diltiazem	Maeso et al. (1999)
COX-Hemmer (nicht selektiv)	Acetylsalicylat-Lysin	Bulut et al. (2003)
	Diclofenac	Hutri-Kahonen et al. (1997)
	Indomethacin	Rubanyi et al. (1993)
Diuretika	Indapamid	Hayakawa et al. (1997)
HMG-CoA-Reduktase- Hemmer	Simvastatin	De Sotomayor et al. (1999)

Tabelle 5: Arzneistoffe, die einen positiven Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion bei arterieller Hypertonie haben (Auswahl).

Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des ACE-Hemmers Captopril sowie der AT₁-Antagonisten Candesartan und Losartan auf die Endothelfunktion bei Standard- und Hochdruckkräften bestimmt wurde, werden im Folgenden diese Arzneistoffklassen näher betrachtet.

5.2.1.1 Einfluss von ACE-Hemmern und AT₁-Antagonisten auf die Endothelfunktion

Es gibt zahlreiche Studien, die zeigen konnten, dass eine in vivo Applikation eines ACE-Hemmers die verminderte Endothel-abhängige Relaxation bei arterieller Hypertension verbessern konnte. Clozel et al. (1990) beobachteten, dass durch eine Langzeitgabe des ACE-Hemmers Cilazapril die funktionellen und morphologischen Veränderungen des Endothels und der Intima bei SHR verhindert werden konnten und schlossen daraus, dass diese Prävention an dem antihypertensiven Effekt der ACE-Hemmer beteiligt sein könnte. Auch Rubanyi et al. (1993) konnten bei Messungen mit SHR neben der blutdrucksenkenden Eigenschaft eine Verbesserung der Endothelfunktion nach einer 2wöchigen Gabe von Cilazapril finden.

Daten von Patienten, die an Bluthochdruck leiden, zeigten eine verbesserte Endothelfunktion in der Unterarmarterie nach oraler Gabe von Captopril. Bei den normotensiven Kontrollprobanden fand dagegen keine Veränderung der ACh-induzierten Relaxation durch den ACE-Hemmer statt (Hirooka et al. 1992).

Offensichtlich können die verschiedenen ACE-Hemmer eine vorhandene endotheliale Dysfunktion unterschiedlich beeinflussen. Darüber hinaus gibt es Unterschiede für deren Wirkung bei den verschiedenen Hypertoniemodellen.

Auch für AT₁-Antagonisten gibt es Studien, die belegen, dass diese die Endothel-vermittelte Vasorelaxation verbessern können. Wiederum erfolgte die Arzneistoffapplikation bei den meisten Untersuchungen in vivo. So konnte nach einer 12wöchigen Losartan-Gabe eine Erhöhung der ACh-vermittelten Relaxation in SHR gezeigt werden (Maeso et al. 1999). Rodrigo et al. (1997)

beobachteten darüber hinaus, dass nach einer 12wöchigen Losartan-Therapie auch die unter Hypertonie gesteigerte Freisetzung von Vasokonstriktoren aus dem Endothel reduziert wurde.

Eine Studie von Ghiadoni et al. (2000) mit Bluthochdruck-Patienten zeigte, dass nach chronischer Behandlung (über 12 Monate) mit Candesartan einerseits die basale NO-Freisetzung in Arterien des Unterarms erhöht und andererseits die durch Endothelin 1 bedingte Vasokonstriktion vermindert worden war. Für Valsartan wurde ebenfalls eine Erhöhung der basalen NO-Produktion und -Freisetzung gefunden (Klingbeil et al. 2003).

In den bisher erwähnten Studien erfolgte die Arzneistoff-Gabe jeweils in vivo, während bei den Messungen dieser Arbeit eine in vitro-Applikation vorlag. Caputo et al. (1995) untersuchten an Carotiden von normotensiven Ratten und SHR die Rolle des Renin-Angiotensin-Systems in der Gefäßwand für die Kontrolle des Vasotonus. Bei den präparierten Gefäßringen wurde nach 20minütiger Inkubation mit Lisinopril [10 μ M] oder Losartan [10 μ M] die Relaxationsfähigkeit erhöht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in der Gefäßwand alle Faktoren, die zum Renin-Angiotensin-System gehören, vorhanden sind und dass diese Kaskade auch in einem vom Körper getrennten Gefäßpräparat ablaufen kann (Caputo et al. 1995).

Auch bei den Messungen der vorliegenden Arbeit wurde der Akuteffekt dieser Arzneistoffgruppe gemessen, wobei hier die Hypertonie durch extrem NaCl-reduzierte Kost erzeugt worden war. Sowohl die akute in vitro Gabe des ACE-Hemmers Captopril als auch der AT₁-Antagonisten Candesartan und Losartan konnte bei den Kontrolltieren und bei den Hochdruckkratten die ACh-vermittelte Relaxation signifikant verbessern. Offensichtlich waren in den untersuchten Rattenaortenpräparaten alle für die Renin-Angiotensin-Kaskade notwendigen

Substrate bzw. Enzyme vorhanden. ACE-Hemmer greifen also nicht nur in die AT II-Freisetzung der Niere ein, sondern verhindern dessen Bildung auch lokal in der Gefäßwand.

Die Verbesserung der Endothelfunktion durch Losartan war bei vorhandenem Bluthochdruck im Vergleich zu den normotensiven Standardratten signifikant höher. Eine Hypertonie-bedingte Veränderung der NO-Bioverfügbarkeit wurde folglich durch die Losartan-Applikation wieder ausgeglichen.

Es ist anzunehmen, dass die verbesserte Endothel-vermittelte Relaxation durch Captopril, Candesartan oder Losartan darauf beruht, dass die Bildung bzw. die Effekte des Vasokonstriktors AT II gehemmt worden waren. Darüber hinaus könnte eine erhöhte Bioverfügbarkeit des NO zur Verbesserung der Endothelfunktion beitragen. Wie Ergebnisse von Friedemann (2000) zeigten, konnte sowohl durch ACE-Hemmer (Captopril) als auch AT₁-Antagonisten (Valsartan) die Radikalproduktion in der Gefäßwand reduziert werden. Die Bioverfügbarkeit für NO könnte folglich unter anderem aufgrund einer geringeren Konzentration von O₂⁻ erhöht werden, da die oben beschriebene Peroxynitritbildung durch die verminderte Anwesenheit von Superoxidanionen geringer ausfällt.

Mit den Messungen der vorliegenden Arbeit am Hypertoniemodell konnte nicht gezeigt werden, dass die ACh-vermittelte Relaxation beeinträchtigt war. Gründe hierfür könnten sein, dass in den Tieren nach einer relativ kurzen Induktionszeit von 2-3 Wochen noch keine ausgesprochene Hypertonie vorlag oder dass nach Stimulation mit KCl der Einfluss einer endothelialen Hyperpolarisation aufgehoben wurde (Makynen et al. 1997).

5.2.2 Diabetes mellitus

Vor allem als Spätfolge kommt es bei Diabetes mellitus zu pathologischen Veränderungen in den Blutgefäßen. Der erhöhte Blutzuckerspiegel hat unter anderem eine vermehrte nichtenzymatische Glykosylierung von Proteinen, z. B. auch von LDL zur Folge, die in der Gefäßwand strukturelle Schäden verursachen und zur diabetischen Makroangiopathie führen können (Taniguchi et al. 1996, Wasty et al. 1993, Rasmussen et al. 1993). Initial wird angenommen, dass durch die diabetische Stoffwechsellage eine endotheliale Dysfunktion induziert wird, die für die Pathogenese der Gefäßschäden von entscheidender Bedeutung ist.

5.2.1.1 Einfluss von Diabetes mellitus auf die Endothelfunktion

Hyperglykämie-induzierter oxidativer Stress sowie verminderte antioxidative Abwehrmechanismen können Einfluss auf die Aktivität des NO nehmen und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Schädigung der Blutgefäße bei Diabetes mellitus (Farkas et al. 2000). Des Weiteren sind hieran die vermehrte Freisetzung von kontraktile Substanzen aus dem Endothel, reduzierte Diffusion des EDRF zur glatten Muskulatur sowie die verminderte Sensibilität der glatten Muskelzellen für NO beteiligt. Die Hauptfaktoren, die die endotheliale Dysfunktion durch Hyperglykämie begünstigen, sind die Aktivierung der Proteinkinase C, die erhöhte Aktivität des Polyol- sowie des Hexosamin-Weges, die nichtenzymatische Glykosylierung und oxidativer Stress (De Vriese et al. 2000, Ceriello 2003).

Die verminderte Insulin-vermittelte Senkung des Blutzuckerspiegels korreliert mit dem Ausmaß der Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen Relaxation

(Mather et al. 2000). Arzneistoffe, die die Insulin-Sensitivität erhöhen, z.B. Metformin, können folglich die Endothelfunktion verbessern (Mather et al. 2001, Watanabe et al. 2000), aber auch die Gabe von ACE-Hemmern, Folat, Thiazolidinonen (z.B. Troglitazon), AT₁-Antagonisten sowie Statinen führte zu einer Verbesserung der Endothel-vermittelten Vasorelaxation bei Diabetes mellitus (De Vriese et al. 2000, Ceriello et al. 2003, Creager et al. 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bei der verschiedene diabetische Behandlungsgruppen untersucht wurden, zeigten, dass in diesem Rattenmodell die therapierten Diabetes-Gruppen tendenziell eine bessere Endothelfunktion aufwiesen als die mit Vehikel behandelten Tiere. Im Vergleich zu den Kontrollen wurde die ACh-induzierte Relaxation durch die Stoffwechselkrankheit jedoch nicht reduziert. Die Beeinträchtigung der Endothelfunktion durch Diabetes mellitus konnte hier, zumindest in vitro, nicht gezeigt werden. Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass der Blutzuckerspiegel während des Behandlungszeitraums von 12 Monaten immer auf 300 mg/dl justiert worden war, so dass eine endotheliale Dysfunktion eventuell noch nicht voll ausgeprägt war.

6 Zusammenfassung

Oxidativer Stress spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen, da das vermehrte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu oxidativen Veränderungen der mit dem Blut zirkulierenden LDL-Partikel sowie der Gefäßwand führt. Intimaschäden, Einbußen der Gefäßwandelastizität und der Endothelfunktion sind Folge dieser Veränderungen und können zu atherosklerotischen Plaques sowie arteriellen Stenosen oder Verschlüssen führen. Aufgrund der resultierenden Durchblutungsstörungen ist die Atherosklerose häufigste Todesursache in den Industriestaaten.

Um die Einflüsse von ROS auf Blutgefäße weiter zu ermitteln, wurde die Wirkung der Hydroperoxide H_2O_2 und *tert.*-BHP sowie der Superoxidanionen, aus KO_2 oder enzymatisch aus Xanthin/XOD gebildet, auf die Radikalfreisetzung, die Kontraktilität und die Endothelfunktion von Gefäßpräparaten verschiedener Spezies untersucht. Darüber hinaus wurde die Endothel-vermittelte Vasorelaxation an Tiermodellen mit arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus gemessen, da bei diesen Krankheiten eine durch ROS-bedingte endotheliale Dysfunktion postuliert wird.

Zur Ermittlung der Peroxid-stimulierten Radikalfreisetzung wurden Ringpräparate aus Rattenaorta, Arteria cerebri media vom Schwein, humanen Plazentagefäßen sowie humaner Arteria mammaria mit unterschiedlichen Konzentrationen von H_2O_2 und *tert.*-BHP inkubiert und die mit Luminol oder Lucigenin vermittelte Chemilumineszenz gemessen. Luminol stellt einen unspezifischen-, Lucigenin einen spezifischen Superoxid-Radikalindikator dar. Die Wirkung von Hydroperoxiden auf die vaskuläre Radikalfreisetzung verhielt sich in allen vier untersuchten Gefäßtypen ähnlich. Die Radikalproduktion wurde

sowohl durch H_2O_2 als auch durch *tert.*-BHP dosisabhängig gesteigert, wobei dieser Effekt, zumindest bei der mit Luminol erfassbaren Radikalproduktion, für H_2O_2 bis zu 1000fach größer sein konnte als für *tert.*-BHP. Die mit Lucigenin messbare Radikalproduktion war durch beide Peroxide wesentlich weniger stimulierbar. Der Anteil der Superoxidradikale an der Gesamtradikalbildung war für H_2O_2 bei den untersuchten Gefäßtypen gering, bei *tert.*-BHP dagegen entsprach die freigesetzte $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Menge in etwa der gesamten Radikalproduktion.

Die Wirkung von H_2O_2 , *tert.*-BHP und KO_2 unterschiedlicher Konzentrationen auf die Steigerung der Kontraktionskraft in Blutgefäßen wurde ermittelt, um die Wirkung von oxidativem Stress auf deren Kontraktilität zu untersuchen. Die Messungen wurden an Präparaten aus Rattenaorta, Kaninchencarotis, humanen Plazentagefäßen sowie Arteria cerebri media vom Schwein durchgeführt, welche sich bei Applikation des Peroxids bereits in vorkontrahiertem Zustand befanden. Bei allen eingesetzten Gefäßspezies hatte eine Zugabe von Peroxid eine Zunahme der Kontraktionskraft zur Folge. Der Betrag der Krafterhöhung unterschied sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Gefäßart, dem verwendeten Peroxid sowie dessen Konzentration. Legt man die relativen Effekte zugrunde, so war der Einfluss der Peroxide auf die Arteria cerebri media vom Schwein am stärksten. Die Kraftzunahme war hier schon für niedrige Konzentrationen auf einem hohen Niveau (Steigerung auf bis zu 400%). Plazentagefäße reagierten ebenfalls sensibler auf die Peroxidbehandlung (Steigerung der Kontraktionskraft auf 150-200%) als Rattenaorten oder Kaninchencarotiden. Bei letzteren lagen die Werte der Kraftzunahme in niedrigeren Bereichen (100-150%).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch der Akuteffekt von ROS auf die Endothel-abhängige Vasorelaxation ermittelt. Die ACh-induzierte Relaxation wurde unter direktem Peroxideinfluss bestimmt, wobei H_2O_2 , *tert.*-

BHP und $O_2^{\cdot-}$ (in Substanz mit KO_2 oder enzymatisch mit Xanthin/XOD gebildet) eingesetzt wurden. Oxidativer Stress induzierte in den verschiedenen Gefäßen unterschiedliche Effekte auf die Endothelfunktion. Dabei hing das Ausmaß des schädigenden Einflusses auf die Vasorelaxation sowohl von der eingesetzten Peroxidkonzentration als auch vom verwendeten Gefäßtyp ab. Sehr empfindlich reagierten die untersuchten Hirngefäße vom Schwein auf die Perfusion mit Radikalbildnern. Hier war schon bei geringer Peroxidkonzentration eine Schädigung der Endothelfunktion zu verzeichnen. Dagegen wiesen Peroxide in Rattenaorten sowie Kaninchencarotiden nicht nur schädigende Eigenschaften auf sondern konnten in den niedrigeren Konzentrationsbereichen zumindest bei kurzzeitiger Applikation die Endothelvermittelte Vasorelaxation verbessern. Generell war bei diesen beiden Gefäßspezies der schädigende Einfluss von *tert.*-BHP größer als von H_2O_2 . Mit KO_2 oder Xanthin/XOD wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Hier trat nach der Perfusion der Gefäße mit dem jeweiligen Radikalbildner entweder eine Beeinträchtigung oder eine Stärkung der endothelialen Relaxation auf. Diese Verbesserung war größer als dies mit H_2O_2 oder *tert.*-BHP der Fall war. Da sowohl durch KO_2 als auch durch Xanthin/XOD Superoxidradikale freigesetzt werden, ist denkbar, dass die Unterschiede der Messwerte aufgrund dieser Radikalspezies auftraten.

Die Ergebnisse der Messungen mit hypertensiven Ratten zeigten, dass sowohl die Applikation des ACE-Hemmers Captopril als auch der AT_1 -Antagonisten Candesartan und Losartan eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion mit sich brachte. Diese Signifikanz ergab sich sowohl bei den Ratten mit Bluthochdruck als auch bei den zur Kontrolle gemessenen Standardratten. Ein schädigender Einfluss des Bluthochdrucks auf die vaskuläre Relaxation konnte mit den vorliegenden Versuchsreihen nicht gezeigt werden. Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass die für die Messungen verwendeten Tiere nur 2

Wochen lang eine Diät zur Induktion einer Hypertonie erhalten hatten, so dass eine endotheliale Dysfunktion eventuell noch nicht ausgebildet worden war. Die Messergebnisse der diabetischen Ratten zeigten, dass die Tiere, die mit den Arzneistoffen Trandolapril (ACE-Hemmer) und BSF (Dopamin D3 Rezeptor-antagonist) behandelt worden waren, zwar tendenziell eine bessere Endothelfunktion aufwiesen als die unbehandelten, jedoch konnte auch hier keine durch die Stoffwechselerkrankung bedingte Verminderung der Endothelfunktion ermittelt werden.

Hydroperoxide können folglich die Radikalproduktion in der Gefäßwand stimulieren und so ihre oxidative Wirkung potenzieren. Darüber hinaus greifen sie in die Regulation des Vasotonus ein, indem sie in Muskelzellen die Kontraktilität steigern und die durch Endothelzellen bedingte Relaxation beeinflussen. Dieser Einfluss ist zunächst Antwort auf die vermehrte oxidative Belastung und kann sogar zellprotektive Mechanismen, wie die Stimulation der NO-Synthase zur Folge haben. ROS stellen somit unter physiologischen Bedingungen wichtige Signalmoleküle dar, die zumindest kurzzeitig zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führen können. Auch die verwendeten Arzneistoffe (Captopril, Candesartan, Losartan), die in den Kreislauf des Vasokonstriktors Angiotensin II eingreifen, können die Endothel-abhängige Vasorelaxation verbessern. Nehmen die ROS-Konzentrationen jedoch pathologisch hohe Werte an, kommt es zum Verlust der Endothelzellularfunktion und zu Gefäßwandschäden.

7 Literaturverzeichnis

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357 (Pt 3): 593-615.

Alam MS, Ku K, Yamauchi M, Hashimoto M, Nosaka S, Hossain MS, et al.: Protective effects of nicaraven, a new hydroxyl radical scavenger, on the endothelial dysfunction after exposure of pig coronary artery to hydroxyl radicals. *Mol Cell Biochem.* 1998; 178: 237-243.

Archer SL, Reeve HL, Michelakis E, Puttagunta L, Waite R, Nelson DP, et al.: O₂⁻ sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 7944-7949.

Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J: Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Moll Life Sci.* 1999; 55: 1078-1087.

Azorin I, Bella MC, Iborra FJ, Fornas E, Renau-Piqueras J: Effect of tert-butyl hydroperoxide addition on spontaneous chemiluminescence in brain. *Free Rad Biol and Med.* 1995; 19 (6): 795-803.

Balligand JL, Feron O, Kelly RA: Role of nitric oxide in myocardial function. In: Ignarro LJ (eds), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology.* Academic Press, San Diego (USA). 2000; 585-632.

Barlow RS, White RE: Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol.* 1998; 257: H1283-H1289.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 1620-1624.

Bharadwaj L, Prasad K: Mediation of H₂O₂-induced vascular relaxation by endothelium-derived relaxing factor. *Mol Cell Biochem.* 1995; 149-150: 267-270.

Boulanger CM: Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31 (1): 39-49.

Bowles DK, Graier WF, Sturek M: Hydrogen peroxide activates Na(+)-dependent Ca(2+) influx in coronary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commu.* 2001; 287 (5): 1134-1139.

Bragulat E, De la Sierra A, Antonio MT, Coca A: Endothelial dysfunction in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension.* 2001; 37 [part2]: 444-448.

Brown MR, Miller FJ, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, et al.: Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1999; 85: 524-533.

Burke TM, Wolin MS: Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol.* 1987; 252: H721-H732.

Bychkov R, Pieper K, Ried C; Milosheva M, Bychkov E, Luft FC, Haller H: Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells. *Circulation.* 1999; 13: 1719-1725.

Cai H, Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87 (10): 840-844.

Cai H, Davis ME, Drummond GR, Harrison DG: Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21 (10): 1571-1576.

Campbell DJ: The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Intern J Biochem Biol.* 2003; 35: 784-791.

Caputo L, Tedgui A, Levy BI: Control of carotid vasomotor tone by local renin-angiotensin system in normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of endothelium and flow. *Circ Res.* 1995; 77 (2): 303-309.

Cardillo C, Campia U, Kilcoyne CM, Bryant MB, Panza JA: Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. *Circulation.* 2002; 105: 452-456.

Ceriello A: The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia.* 2003; 46 Suppl 1: M9-M16.

Cherry PD, Omar HA, Farrell KA, Stuart JS, Wolin MS: Superoxide anion inhibits cGMP-associated bovine pulmonary arterial relaxation. *Am J Physiol.* 1990; 259: H1056-H1062.

Clozel M, Kuhn H, Hefti F: Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and of hydralazine on endothelial function in hypertensive rats. *Hypertension.* 1990; 16 (5): 532-540.

Cordellini S: Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: possible involvement of prostaglandin endoperoxides. *Gen Pharmacol.* 1999; 32 (3): 315-320.

Cosentino F, Barker JE, Brand MP, Heales SJ, Werner ER, Tippins JR, et al.: Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 496-502.

- Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA: Diabetes and vascular disease. Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*. 2003; 108: 1527-1532.
- Degnim AC, Morrow SE, Ku J, Zar HA, Nakayama DK: Nitric oxide inhibits peroxide-mediated endothelial toxicity. *J Surg Res*. 1998; 75 (2): 127-134.
- De Keulenaer GW, Chappel DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK: Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxid-producing NADH oxidase. *Circ Res*. 1998; 82: 1094-1101.
- De Sotomayor AM, Concepción PG, Herrera D, Marhuenda E: Effects of chronic treatment with simvastatin on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1999; 17: 769-776.
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhouette PM: Endothelial dysfunction in diabetes. 2000; 130 (5): 963-974.
- De Wit C, Roos F, Bolz SS, Pohl U: Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genom*. 2003; 13 (2): 169-177.
- Dierks EA, Burstyn JN: Nitric oxide (NO), the only nitrogen monoxide redox form capable of activating soluble guanylyl cyclase. *Biochem Pharmacol*. 1996; 51: 1593-1600.
- Durante W, Sen AK, Sunahara FA: Impairment of endothelial-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 1988; 94: 463-468.
- Elliott SJ, Eskin SG, Schilling WP: Effect of t-butyl-hydroperoxide on bradykinin-stimulated changes in cytosolic calcium in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1989; 264 (7): 3806-3810.
- Elliott SJ, Doan TN: Oxidant stress inhibits the store-dependent Ca^{2+} -influx pathway of vascular endothelial cells. *Biochem J*. 1993; 292 (Pt 2): 385-393.
- Elliott SJ, Doan TN, Henschke PN: Reductant substrate for glutathione peroxidase modulates oxidant inhibition of Ca^{2+} signaling in endothelial cells. *Am J Physiol*. 1995; 268 (1 Pt 2): H278-H287.
- Elmoselhi AB, Samson SE, Grover AK: SRCa^{2+} pump heterogeneity in coronary artery: free radicals and IP₃-sensitive and -insensitive pools. *Am J Physiol*. 1996; 271: C1652-C1659.

Emmerich M: Modulation mechanischer funktioneller Parameter und der Radikalsekretion in arteriellen Gefäßwänden durch atherogene Risikofaktoren. Dissertation Universität Tübingen. 2003.

Farkas K, Sarman B, Jermendy G, Somogyi A: Endothelial nitric oxide in diabetes mellitus: too much or not enough? *Diabetes Nutr Metab.* 2000; 13 (5): 287-297.

Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, et al.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res.* 2001; 88:44-51.

Friedemann G: Oxidativer Stress bei Atherogenese. Untersuchungen zur Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten in der arteriellen Gefäßwand. Dissertation Universität Tübingen. 2000.

Gagelmann M, Mrwa U, Bostrom S, Rüegg JC, Hartshorne D: Effect of Ca^{2+} -independent myosin light chain kinase on different skinned smooth muscle fibers. *Pflugers Arch.* 1984; 401: 107-109.

Gerzer R, Böhme E, Hofmann F, Schultz G: Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Lett.* 1981; 132: 71-74.

Ghiadoni L, Viridis A, Magagna A, Taddei S, Salvetti A: Effect of the angiotensin II type 1 Receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension.* 2000; 35 (1 Part 2) Suppl: 501-510.

Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R: A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res.* 2000; 87 (1): 26-32.

Gonzales-Flecha B, Llesuy S, Boveris A: Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med.* 1991; 10 (2): 93-100.

Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M: Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20 (10): 2175-2183.

Grover AK, Samson SE: Effekt of superoxide radical on Ca^{2+} pumps of coronary artery. *Am J Physiol.* 1988; 255: C297-C303.

Grover AK, Samson SE, Fomin VP: Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. *Am J Physiol.* 1992; 263: H537-H543.

- Gugeler N: Peroxidationsreaktionen bei der Atherogenese: Modulatoren der LDL-Oxidation und der Radikalbildung von Makrophagen. Dissertation Universität Tübingen. 1997.
- Gutteridge JMC, Westermarck T, Halliwell B: Oxygen radical damage in biological systems. In: Johnson JE, et al. (eds). Free radicals, aging, and degenerative diseases. Alan R Liss Inc New York. 1985; 99-139.
- Halliwell B: The role of oxygen radicals in human disease, with particular references to the vascular system. *Haemostasis*. 1993; 23 (suppl 1): 118-126.
- Hayakawa HMD, Coffee KBS, Raij LMD: Endothelial dysfunction and cardiorenal injury in experimental salt-sensitive hypertension: effects of antihypertensive therapy. *Circulation*. 1997; 96 (7): 2407-2413.
- Heinle H: Influence of oxidative stress on metabolic and contractile functions of arterial smooth muscle. In: *Oxygen Sensing in Tissues*. Springer Verlag Heidelberg. 1988; 151-164.
- Heinle H, Veigel C, Lindner V: Einfluss von Sauerstoff bzw. Hydroperoxiden auf das Kontraktionsverhalten der arteriellen Gefäßwand. In: *Funktionsanalyse biologischer Systeme* (eds). Gustav Fischer Verlag 1989; 19: 47-52.
- Heinle H, Tries S, Veigel C: Is the cellular thiol-disulfide system involved in oxygen sensitivity of arterial contraction. In: Eyzaguirre C, Fidone SJ, Fitzgerald RS, Lahiri S, McDonald DM (eds). *Arterial Chemoreception*; Springer-Verlag, New York. 1990; 446-451
- Heinle H, Roth D, Wolburg-Buchholz K: Effects of lipid peroxidation and oxygen free radicals in atherogenesis. *Pharm Pharmacol Lett*. 1993; 3: 89-92.
- Heinle H, Wülfroth P, Quack G, Lang F: Effects of the new antioxidant Nicanartine in an experimental model of atherosclerosis. *Arzneimittelforschung*. 1996; 46: 956-959.
- Heinle H: Physiologie und Pathophysiologie der Arterien. In: Marshall und Breu (eds). *Handbuch der Angiologie*. Ecomed. 1999; II-1.2: 1-13.
- Henschke PN, Elliott SJ: Oxidized glutathione decreases luminal Ca^{2+} content of the endothelial cell ins(1,4,5)P₃-sensitive Ca^{2+} store. *Biochem J*. 1995; 312 (Pt2): 485-489.
- Heraldo P. Souza, Arturo J. Cardounel and Jay L. Zweier: Mechanisms of free radical production in the vascular wall. *Coron Artery Dis*. 2003; 14 (2): 101-107.
- Hirooka Y, Imaizumi T, Masaki H, Ando S, Harada S, Momohara M, Takeshita A: Captopril improves impaired endothelium-dependent vasodilation in hypertensive patients. *Hypertension*. 1992; 20 (2): 175-180.

Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J: Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci.* 2000; 113: 1671-1676.

Hsieh CC, Yen MH, Yen CH, Lau YT: Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Res.* 2001; 49: 135-145.

Hu Q, Corda S, Zweier JL, Capogrossi MC, Ziegelstein RC: Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 1998; 97 (3): 268-275.

Hutri-Kahonen N, Kahonen M, Tolvanen JP, Wu X, Sallinen K, Porsti I: Ramipril therapy improves arterial dilation in experimental hypertension. *Cardiovasc Res.* 1997; 33 (1): 188-195.

Ignarro LJ: Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J.* 1989; 3: 31-36.

Kamm KE, Stull JT: The function of myosin light chain kinase phosphorylation of smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985; 25: 593-620.

Katusic ZS, Vanhouette PM: Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol.* 1989; 257: H33-H37.

Keaney JF Jr, Vita JA: Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995; 38: 129-154.

Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA: Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension.* 1999; 33: 1353-1358.

Klingbeil AU, John S, Schneider MP, Jacobi J, Handrock R, Schmieder RE: Effect of AT1 receptor blockade on endothelial function in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2003; 16 (2): 123-128.

Knoblauch AL, Paky A, Michael JR, Kutner ME, Cadenas E, Sies H, et al: Hydroperoxide-induced chemiluminescence in rabbit lungs: role of arachidonic acid enzymes. *J Appl Physiol.* 1988; 65(3): 1340-50

Kojda G, Kottenberg K: Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc Res.* 1999; 41 (3): 514-523.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG: Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension [see comments]. *Circulation.* 1997; 95: 588-593

Lee VM, Quinn PA, Jennings SC, Leong L: Neutrophil activation and production of reactive oxygen species in pre-eclampsia. *J Hypertens*. 2003; 21: 395-402.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H: Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol*. 2001; 91: 1421-1430.

Lockette W, Otsuka Y, Carretero O: The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension*. 1986; 8: II61-II66.

Lötscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E, Richter C: Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 4340-4344.

Lounsbury KM, Qinghua H, Ziegelstein RC: Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Rad Biol Med*. 2000; 28 (9): 1362-1369.

Maeso R, Navarro-Cid J, Rodrigo E, Ruilope LM, Cachofeiro V, Lahera V: Effects of antihypertensive therapy on factors mediating endothelium-dependent relaxation in rats treated chronically with L-NAME. *J Hypertens*. 1999; 17 (2): 221-227.

Maeso R, Navarro-Cid J, Rodrigo E, Ruilope LM, Lahera V, Cachofeiro V: Differential effects of losartan and doxazosin on vascular function in senescent spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1999; 12 (11 Pt 1): 1105-1108.

Makynen H, Kahonen M, Wu X, Hutri-Kahonen N, Tolvanen JP, Porsti I: Arterial function in mineralocorticoid-NaCl hypertension: influence of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Pharmacol Toxicol*. 1997; 81 (4): 180-189.

Markant A, Rimbach G, Krämer K, Mayer H, Pallauf J: Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *Pharm Z*. 1995; 140 (26): 3-14.

Mather K, Laakso M, Edelman S, et al.: Evidence for physiological coupling of insulin-mediated glucose metabolism and limb blood flow. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 279: E1264-E1270.

Mather KJ, Verma S, Anderson TJ: Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37: 1344-1350.

Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov YP, Melinka LM, Arkhipenko YV: The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res Cardiol*. 1982; 77: 465-485.

Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, et al.: Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*. 2001; 37: 414-418.

Mügge A: The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Z Kardiol.* 1998; 87: 851-864.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al.: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000; 404: 787-790.

Nuhn P: *Naturstoffchemie* (eds Hirzel). Wiss. Verlagsges. Stuttgart 1990.

Nunes VW, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH, Zorn TM, Scivoletto R: Influence of enalapril on the endothelial function of DOCA-salt hypertensive rats. *Gen Pharmacol.* 2000; 34 (2): 117-125.

Orrenius S, Jewell SA, Bellomo G, Thor H, Jones DP, Smith MT: Regulation of calcium compartmentation in the hepatocyte - a critical role of glutathione. In: Larsson A et al. (eds) *Functions of glutathione: biochemical, physiological, toxicological and clinical aspects.* Raven; New York. 1983; 261-271.

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.* 1993; 91: 2546-2551.

Pagliari P: Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Science.* 2003; 73: 2137-2149.

Panza JA, Quyyumi AA, Callahan TS, Epstein SE: Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 21 (5): 1145-1151.

Plecko T, Rügauer M, Kruse-Jarres JD: *Der oxidative Stress.* Klinische Chemie. 1998; 13: 624-630.

Rapoport RM, Murad F: Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 1983; 52: 352-357.

Rasmussen LM, Ledet T: Aortic collagen alterations in human diabetes mellitus. Changes in basement membrane collagen content and in the susceptibility of total collagen to cyanogen bromide solubilisation. *Diabetologia.* 1993; 36 (5): 445-453.

Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL, Pagano PJ: Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). *Circulation.* 2002; 106 (19): 2497-2502.

Rodrigo E, Maeso R, Munoz-GarciaR, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Cachofeiro V, Lahera V: Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *J Hypertens.* 1997; 15: 613-618.

Roveri A, Coassin M, Maiorino M, Zamburlini A, Van Amsterdam FTM, Ratti E, Ursini F: Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 297 (2): 265-270.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM: Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1986; 250: H815-H821.

Rubanyi GM: Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Rad Biol Med*. 1988; 4: 107-120.

Rubanyi GM, Kauser K, Graser T: Effect of cilazapril and indomethacin on endothelial dysfunction in the aortas of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22 Suppl 5: S23-S30.

Sanders SP, Zweier JL, Kuppusamy P, Harrison SJ, Bassett DJ, Gabrielson EW, et al.: Hyperoxid sheep pulmonary microvascular endothelial cells generate free radicals via mitochondrial electron transport. *J Clin Invest*. 1993; 91: 46-52.

Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M: No .NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93 (25): 14492-14497.

Shimizu S, Shiota K, Yamamoto S, Miyasaka Y, Ishii M, Watabe T, et al.: Hydrogen peroxide stimulates tetrahydrobiopterin synthesis through the induction of GTP-cyclohydrolase I and increases nitric oxide synthase activity in vascular endothelial cells. *Free Rad Biol Med*. 2003; 34 (10): 1343-1352.

Siems WG, Sommerburg O, Mayer H, Grune T: Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus. *Pharm Z*. 1998; 143: 1515-1527.

Soloviev AI, Parshikov AV, Stefanov AV: Evidence for the involvement of proteinkinase C in depression of endothelium-dependent vascular responses in spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res*. 1998; 35 (5): 325-331.

Stone JR, Marletta MA: Soluble guanylyl cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterisation of the ferrous and ferric states. *Biochem J*. 1994; 33: 5636-5640.

Stumpe KO: Vitamin E und Arteriosklerose. *Deut Apotheker Z*. 1996; 42: 2-4.

Suzuki YJ, Ford GD: Inhibition of Ca(2+)-ATPase of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum by reactive oxygen intermediates. *Am J Physiol*. 1991; 261: H568-H574.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Favilla S, Pompella A, Salvetti A: Restoration of nitric oxide availability after calcium antagonist treatment in essential hypertension. *Hypertension*. 2001; 37: 943-948.

Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M, Takahashi M, Wenyi C, Higashiyama S, et al.: Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes*. 1996; 45 Suppl 3: S81-S83.

Thomas SR, Chen K, Keaney JF Jr: Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2002; 277 (8): 6017-6024.

Thomas WG, Mendelsohn FAO: Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Intern J Biochem Cell Biol*. 2003; 35: 774-779.

Tiritilli A: Nitric oxide (NO), vascular protection factor. Biology, physiological role and biochemistry of NO. *Presse Medicale*. 1998; 27 (21): 1061-1064.

Trimm JL, Salama G, Abramson JJ: Sulfhydryl oxidation induces rapid calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem*. 1986; 261: 16092-16099.

Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM: Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension. *Circulation*. 2001; 104: 511-514.

Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U: Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension*. 2003; 41 (3): 534-439.

Van Hinsbergh VWM. NO or H₂O₂ for endothelium-dependent vasorelaxation: Tetrahydrobiopterin makes the difference. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 719-721.

Vanhouette PM: Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989; 13 (6 Pt 2): 658-667.

Walia M, Sormaz L, Samson SE, Lee RMKW, Grover AK: Effects of hydrogen peroxide on pig coronary artery endothelium. *Eur J Pharmacol*. 2000; 400: 249-253.

Wasty F, Alavi MZ, Moore S: Distribution of glycosaminoglycans in the intima of human aortas: changes in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1993; 35 (4): 316-322.

Watanabe Y, Sunayama S, Shimada K, et al.: Troglitazone improves endothelial dysfunction in patients with insulin resistance. *J Atheroscler Thromb*. 2000; 7: 159-163.

Wei EP, Kontos HA, Beckman JS: Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am J Physiol*. 1996; 271: H1262-H1266.

White CR, Darley-USmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, et al.: Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 8745-8749.

Wink DA, Feelisch M: Formation and detection of nitroxyl and nitrous oxide, Methods. In: Stamler J, Feelisch M (eds.), *Nitric Oxide Research*. Wiley, New York (USA). 1996; 403-412.

Wolin MS: Activated oxygen metabolites as regulators of vascular tone. *Klin Wochenschr*. 1991; 69: 1046-1049.

Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL: Superoxide generation from endothelial nitric-oxidase synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*. 1998; 273: 25804-25808.

Yang ZW, Zheng A, Altura BT, Altura BM: Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharm*. 1998; 344 (2-3): 169-181.

Yuan XM, Brunk UT: Iron and LDL-oxidation in atherogenesis. *APMIS* 1998; 106: 825-842.

Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J: Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16 Suppl 1: 2-5.

Zweier JL, Broderick R, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Luty GA: Determination of the mechanism of free radical generation in human aortic endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *J Biol Chem*. 1994; 269: 24156-24162.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACh	Acetylcholin
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AT ₁	Angiotensin II Rezeptortyp 1
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BSF	Dopamin D3 Rezeptorantagonist Typ 201640 der Firma BASF: 2-(3-(4-(2-t-Butyl-6-trifluormethyl)pyrimidin-4-yl)piperazin-1-yl)propylmercaptopyrimidin-4-ol-fumarat
cGMP	cyclisches Guanosylmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
3-DG	3-Deoxyglucoson
DNA	Desoxyribonucleinsäuren
DOCA	Deoxycorticosteron
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
ET	Endothelin
FGF	Fibroblast Growth Factor
GSH	Glutathion
i.p.	intra peritoneal
IP ₃	Inositoltriphosphat

JAK	Janus-Aktivierte Kinase
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase
GSSG	oxidiertes Glutathion
GTP	Guanosyltriphosphat
HB-EGF	Heparin-Binding Epidermal Growth Factor
H ₄ B	Tetrahydrobiopterin
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym A
IDDM	Insulin-Dependent-Diabetes-Mellitus
LDL	Low Density Lipoprotein
MAPK	Mitogen-Aktivierte Protein-Kinase
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MW	Mittelwert
NA	Nitroarginin
NAD(P)H	Nicotin-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat)-Hydrolase
NAME	Nitro-arginin-methylester
NOS	NO-Synthase
oxLDL	oxidativ modifiziertes Low Density Lipoprotein
PDGF	Platelet-Derived Growth-Factor
PGF _{2alpha}	Prostaglandin F _{2alpha}
PKC	Proteinkinase C
ROS	Reactive-Oxygen-Spezies
s.c.	sub cutan
SD	Standardabweichung
SERCA	Sarco(Endo)plasmatic Reticulum Ca ²⁺ -transporting ATPase
sGC	soluble Guanylatcyclase
SHR	Spontaneously-Hypertensive-Rats
SMC	Smooth Muscle Cells
SOD	Superoxiddismutase
SR	Sarkoplasmatisches Reticulum

STAT	Signal-Transducer and Activator of Transcription
STZ	Streptocotozin
Tab.	Tabelle
<i>tert.</i> -BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
U	Units
VIP	Vascular Intestinal Peptid
XOD	Xanthinoxidase

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Helmut Heinle für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung, seine ständige Gesprächsbereitschaft sowie für die angenehme Zusammenarbeit.
- Herrn Prof. Dr. Stefan Laufer für die Übernahme des Referates der Dissertation.
- Meiner Mitbewohnerin Ulrike Vosseler für ihre treue Begleitung durch Höhen und Tiefen.
- Meiner Schwester Irina und meinem Schwager Olaf für ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit.
- Felor Amraei-Davijani für ihre Ermutigungen und tatkräftige Hilfe und Unterstützung.
- Ines Germann, Uschi Pascht, Ninja Jardin, Horst Apfel, Philipp Heider, Martin Emmerich und Wolfram Reimann für die angenehme Atmosphäre im Labor sowie die Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit.
- Frau Priv.-Doz. Dr. Albinus, Frau Priv.-Doz. Dr. Hornung, Herrn Dr. Luippold, Herrn und Frau Makdessi, Herrn Priv.-Doz. Dr. Scheule, Thorsten Staudacher sowie der Metzgerei Kiesinger für das Überlassen von Gefäßpräparaten.
- Frau Dr. Ute Brehme aus dem Institut für Arbeits- und Sozialmedizin für die Kaninchencarotis-Präparate sowie ihre freundliche und fachkundige Antworten auf meine Fragen.
- Meinen Freunden Andrea und Thomas Schenkel, Daniela Kleinheinz, Michaela Duchek und Cornelia Taut für ihre Begleitung während der Zeit meiner Promotion.
- Markus Röger und Cornelia Taut für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

- Herrn Dr. und Frau Ullbrich sowie meinen Kollegen, mit denen ich in der Apotheke am Lustnauer Tor zusammengearbeitet habe, für die schöne Arbeitsatmosphäre und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Meinen Eltern und meiner Oma möchte ich besonders danken, da sie mir mein Studium ermöglicht und auch meine Promotion stets mit Interesse und Anteilnahme begleitet haben.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. Ammon, Dr. Beyer, Prof. Dr. Drews, Prof. Dr. Gauglitz, Prof. Dr. Heide, Prof. Dr. Heinle, Prof. Dr. Kovar, Prof. Dr. Laufer, Dr. Mechler, PD Dr. Safayhi, Prof. Dr. Schmidt, Prof. Dr. Schultz, Prof. Dr. Wahl, Prof. Dr. Wankmüller, Dr. Zimmermann.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

30.10.1975 Anneke Margarete Blumenstein, geboren in Spaichingen,
Tochter von Klaus Blumenstein und Heike Blumenstein geb.
Schneckenburger

Schulausbildung:

1982-1986 Grund- und Hauptschule Aldingen
1986-1995 Gymnasium Trossingen

Hochschulausbildung:

1996-2000 Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

Praktische Ausbildung:

2000-2001 Praktisches Jahr in der Apotheke am Lustnauer Tor in
Tübingen
12.07.01 Approbation als Apothekerin

Berufliche Tätigkeit:

09/2001 Apotheke am Lustnauer Tor in Tübingen
09/2001 Beginn der Dissertation mit dem Titel „Oxidativer Stress und
Gefäßfunktion: Untersuchungen zum Einfluss von
Hydroperoxiden auf Kontraktion und Endothelfunktion in
Arterien“ unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Heinle im
Physiologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen