

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. S. Blankenberg

Untersuchung zur Bedeutung der leukozytären Peroxidase Myeloperoxidase für die Nikotin-induzierte Beeinträchtigung der endothelialen Funktion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Andreas Muth
aus Nürnberg

Hamburg 2013

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10. Juni 2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Karsten Sydow

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. Stephan Baldus

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Nikotin und kardiovaskuläre Erkrankungen	6
1.2	Endotheliale Funktion und Dysfunktion	7
1.3	Der neutrophile Granulozyt	9
1.4	Die Myeloperoxidase	11
1.4.1	Chemische Struktur	12
1.4.2	Katalytische Aktivität: das MPO System	13
1.5	Nikotin	19
1.5.1	Allgemeine Informationen	19
1.5.2	Nikotin in Zigaretten	20
1.5.3	Nikotin-Metabolismus in Menschen und Säugetieren	21
1.5.4	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor (nAChR)	22
1.6	Arteriosklerose	24
1.6.1	Atherogenese	24
1.6.2	Die Beeinflussung der Atherogenese durch MPO	24
1.6.3	Die Beeinflussung der Atherogenese durch Nikotin	25
1.7	Ziel dieser Arbeit	29
2	Material und Methoden	30
2.1	Material	30
2.1.1	Reagenzien und Pharmaka	30
2.1.2	Puffer und Lösungen	31
2.1.3	Antikörper	32
2.1.4	Reaktionskits	32
2.1.5	Mauslinien	32
2.1.6	Geräte, Apparaturen, Computerprogramme	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	<i>in vitro</i> -Teil	33
2.2.2	<i>in vivo/ex vivo</i> -Versuchsreihe: Nikotineffekt in der Maus	36
2.2.3	Statistik	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Nikotin steigert die Adhäsion neutrophiler Granulozyten	47
3.1.1	Die Beeinflussung der Adhäsion neutrophiler Granulozyten durch Nikotin	47
3.1.2	Unterdrückung der Nikotinwirkung durch Blockade des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors	49
3.2	Nikotin verursacht eine Degranulation der PMN und MPO Freisetzung	50
3.3	Nikotin bewirkt eine Infiltration/Rekrutierung neutrophiler Granulozyten	52
3.3.1	Nikotin beeinflusst die Infiltration/Rekrutierung	52
3.4	Nikotin führt zur Verschlechterung der Endothelfunktion	54
3.4.1	Die Endothelfunktion der Wildtyp-Maus nach akuter Nikotinapplikation	54
3.4.2	Die Endothelfunktion der MPO-KO-Maus nach akuter Nikotinapplikation	57
3.4.3	Unterschiede zwischen Wildtyp und MPO KO: Die MPO-Abhängigkeit der Endothelfunktion	60
3.4.4	Fluss und Fließgeschwindigkeit nach chronischer Nikotinapplikation	62

4 Diskussion.....	65
4.1 Nikotin - aktivierender oder hemmender Einfluss.....	65
4.2 Nikotinkonzentration im Versuch	67
4.3 Die Bedeutung des Nikotins für die Adhäsion	69
4.4 Die Bedeutung des Nikotins für die Degranulation.....	70
4.5 Die Bedeutung von Nikotin für die Infiltration/Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Gewebe.....	72
4.6 Die Bedeutung von Nikotin für die Endothelfunktion.....	74
4.7 Daraus resultierende Behandlungsmöglichkeiten	76
4.7.1 Therapeutische Nutzung des nACh-Rezeptors	76
4.7.2 Modulation einzelner Nikotin-Effekte	77
4.7.3 MPO-Liberation	77
5 Zusammenfassung	79
6 Abkürzungsverzeichnis.....	80
7 Literaturverzeichnis	83
8 Danksagung.....	96
9 Lebenslauf.....	97
10 Eidesstattliche Versicherung.....	98

Arbeitshypothese und Fragestellung

Bedeutung des neutrophilen Granulozyten und seines Enzyms, der leukozytären Peroxidase Myeloperoxidase, für die Nikotin-induzierte Beeinträchtigung der endothelialen Funktion

Die Arteriosklerose ist eine chronische Erkrankung der Blutgefäße und resultiert aus einem kontinuierlich entzündlichen Milieu der Gefäßwand. Leukozyten und vor allem neutrophile Granulozyten spielen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung dieses Milieus eine zentrale Rolle. Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym der neutrophilen Granulozyten, welches bei der Aktivierung der Zellen ausgeschüttet wird. Durch seine katalytischen Fähigkeiten ist es nachweislich für diverse proinflammatorische und damit proarteriosklerotische Wirkungen der neutrophilen Granulozyten verantwortlich. Laut unserer Hypothese ist Myeloperoxidase wesentlich an der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion beteiligt, indem es die Bioverfügbarkeit für Stickstoffmonoxid reduziert. Diese Dysfunktion wird in der aktuellen Wissenschaft als der initiale Schritt der Arteriogenese angesehen. Nikotin ist als wesentlicher Bestandteil des Tabaks für die Entwicklung zahlreicher Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems verantwortlich, so auch der Arteriosklerose und der koronaren Herzkrankheit.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit Nikotin an der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion beteiligt ist. Genauer soll untersucht werden, welchen Einfluss Nikotin auf die neutrophilen Granulozyten nimmt. Dabei sollen unter anderem zentrale Mechanismen, wie die Zellaktivierung und MPO-Freisetzung untersucht werden. Darauf aufbauend soll im Tierversuch die Wirkung von Nikotin auf die Endothelfunktion sowie ihr Zusammenhang mit Myeloperoxidase untersucht werden.

Mit diesem Projekt wäre es möglich, einen maßgeblichen Mechanismus der Nikotin-induzierten Entwicklung der Arteriosklerose aufzuzeigen und eventuell einen Beitrag zu leisten zu gezielteren und suffizienteren Therapiemöglichkeiten in diesem Bereich.

1 Einleitung

1.1 Nikotin und kardiovaskuläre Erkrankungen

Rauchen ist das häufigste vermeidbare Gesundheitsrisiko unserer Zeit. Tabak und seine Inhaltsstoffe, allen voran das Nikotin, sind als Hauptursache für Krebserkrankungen, Atemwegserkrankungen sowie Herz- und Gefäßerkrankungen anzusehen (Talhout u. a. 2011). Ein großes Problem bei dem Versuch der Einschränkung dieses Risikos sind die starke körperliche Abhängigkeit und die gesellschaftliche Akzeptanz des Rauchens. Obwohl es sich beim Rauchen bewiesenermaßen um einen massiven gesundheitlichen Risikofaktor handelt, ist es in der Gesellschaft weit verbreitet. Nach einer Schätzung der WHO gab es im Jahr 2000 weltweit ca 1,1 Milliarden Raucher (Mackay J u. a. 2002). Alleine in Deutschland konsumieren 32,5 % der deutschen Bevölkerung zwischen 18 und 79 Jahren regelmäßig Tabak in Form von Zigaretten (Schulze und Lampert 2006). Dabei sind die Folgen langjährigen Tabakkonsums fatal. Laut einem Bericht der World Health Organisation (WHO) sterben weltweit jährlich mehr als 5,4 Millionen Menschen an Tabak-assoziierten Erkrankungen (WHO Report on the Global Tobacco Epidemic: The MPOWER Package. WHO; Geneva, Switzerland: 2008. pp. 1–329.).

Wie bereits erwähnt, ist das Rauchen eine der Hauptursachen kardiovaskulärer Erkrankungen wie etwa der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, des Aortenaneurysmas, des Schlaganfalls oder der koronaren Herzkrankheit (Herold G. et al. 2011). Es zeigte sich, dass Raucher ein doppelt bis dreifach erhöhtes Risiko tragen, eben diese Krankheiten zu entwickeln (Rudolph, Rudolph, und Baldus 2008). Darunter ist die Koronare Herzkrankheit (KHK) und damit die Arteriosklerose mit fast 20 % sogar die häufigste Todesursache in Deutschland (Herold G. et al. 2011). Etwa 40 % aller durch das Rauchen begründeten Todesfälle sind Folge eines ischämischen Herzleidens auf Grund einer KHK. Das Ausmaß des Tabakkonsums korreliert dabei mit dem Auftreten des plötzlichen Herztodes (Talhout u. a. 2011).

Nikotin ist demnach als ein wesentlicher gesundheitlicher Risikofaktor anzusehen. Doch wie hängt Nikotin und die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen, wie der Arteriosklerose zusammen? Ein vermeintlicher Zusammenhang ergibt sich durch die Entwicklung eines besonderen pathologischen Zustands des Gefäßsystems, der als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird.

1.2 Endotheliale Funktion und Dysfunktion

Die Blutgefäße des Herz-Kreislauf-Systems bestehen im Allgemeinen aus drei Wandschichten. Von innen nach außen sind das die Tunica intima, Tunica media und Tunica externa. Während die Tunica externa hauptsächlich für die Einbettung in das umliegende Gewebe sorgt und die Tunica media mit ihren glatten Muskelzellen für die Umsetzung des Gefäßtonus zuständig ist, kommen der Tunica intima mit ihrem Endothel wesentliche Aufgaben der Kommunikation und Interaktion mit Blutbestandteilen und dem umliegenden Gewebe zu. Das Endothel bildet die zum Lumen gerichtete innere Zellschicht der Blutgefäße. Abhängig von der Durchlässigkeit für verschiedene Blutbestandteile unterscheidet man ein kontinuierliches, ein fenestriertes und ein diskontinuierliches Endothel. Auf ihrer Oberfläche tragen die Endothelzellen eine Schicht aus Polysacchariden, die Glykokalix.

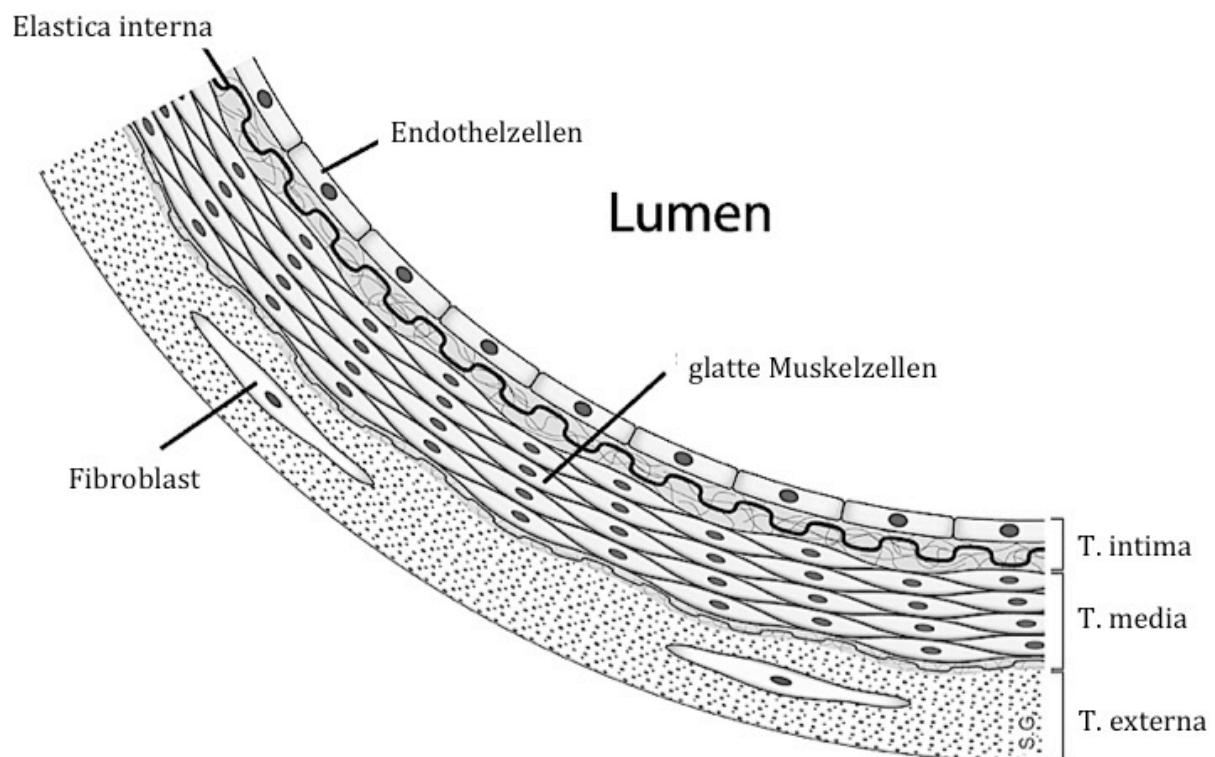


Abb. 1: Wandaufbau einer Arterie; Modifiziert nach: Anatomy overview of a human artery made for PhD project. Maastricht, november 2005. Stijn A.I. Ghesquiere www.applesnail.net

Das Endothel bildet den zentralen Modulator verschiedenster vaskulärer Funktionen. So regelt es Austauschvorgänge, ist am Gerinnungssystem beteiligt und dirigiert die Regulation des Gefäßtonus. Letzteres wird erreicht, indem das Endothel vasoaktive Substanzen wie z.B. Noradrenalin, Serotonin oder das vasoaktive Adeninnukleotid ATP aufnimmt und diese metabolisiert. Viel bedeutender ist allerdings die Tatsache der eigenen Produktion und Freisetzung vasoaktiver Autakoide. So werden zum Beispiel gefäßerweiternde Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin (PGI₂), natriuretisches Peptid Typ C (CNP), sowie die gefäßverengend wirkenden Peptide Endothelin-1 und Urotensin II vom Endothel gebildet.

Dabei scheint NO eine Schlüsselrolle einzunehmen. NO wird durch das Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS), aus der Aminosäure L-Arginin gebildet, welches ein Calcium-Calmodulin-abhängiger Prozess ist. So wird NO kontinuierlich vom Endothel freigesetzt und wirkt damit der sympathisch adrenergen Gefäßengstellung, der so genannten Vasokonstriktion, entgegen. Eine weitere Quelle des NO kann die induzierbare NO Synthase sein (iNOS), die unter anderem auch in der glatten Muskulatur der Gefäße exprimiert wird. Sie wird durch Endotoxine und Zytokine aktiviert und produziert ein Vielfaches im Vergleich zur eNOS. Das produzierte NO aktiviert die lösliche Guanylylzyklase, welche ein Absinken des intrazellulären Calciums in der glatten Muskulatur bewirkt und so zur Muskelrelaxation und Gefäßweitstellung, der sogenannten Vasodilatation, beiträgt (Ignarro u. a. 1982).

Dem Stickstoffmonoxid kommen neben der Tonusmodulation noch weitere vasoprotektive, anti-arteriosklerotische Funktionen hinzu. NO hemmt beispielsweise die Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion (Radomski, Palmer, und Moncada 1987), die Leukozytenadhäsion (Kubes, Suzuki, und Granger 1991), sowie die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur (Desjardins und Balligand 2006). NO hemmt außerdem die Produktion von proarteriosklerotischen Substanzen wie den Adhäsionsmolekülen P-Selektin und E-Selektin (Gries u. a. 1998), sowie die des Monozyten Chemokins MCP-1 (S. K. Lee u. a. 2002). Über diese Moleküle und Mechanismen können Monozyten und Leukozyten angelockt werden und in die Gefäßwand einwandern. Dies stellt einen initialen Schritt der Arteriogenese dar. Ein weiterer Faktor, der die Bioverfügbarkeit von NO beeinflusst, ist die NADPH-Oxidase, welche unter anderem in der Gefäßwand und auch in Granulozyten exprimiert wird. Sie wird zum Beispiel durch Angiotensin II oder Thrombin aktiviert und produziert das Superoxidanion (O₂⁻). NO reagiert mit O₂⁻ zu

Peroxynitrit (ONOO⁻), einem sehr potenten Oxidationsmittel und wird dadurch verbraucht. Die Sauerstoffradikale reagieren wiederum selbst zu anderen reaktiven Sauerstoffspezies, wie etwa Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

Sind die normalen Funktionen des Endothels gestört, beispielsweise durch eine arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie oder bereits bestehende Arteriosklerose, resultiert eine Dysfunktion des Endothels und es überwiegen die vasokonstriktiven Einflüsse. Die endotheliale Dysfunktion beinhaltet verschiedene, maßgebliche Veränderungen der endothelialen Eigenschaften, welche in eine reduzierte NO Bioverfügbarkeit münden und eine Einschränkung, beziehungsweise den vollständigen Verlust der endothelvermittelten Vasodilatation, sowie den Verlust von vasoprotektiven Funktionen bedeuten. So ist beispielsweise die gesteigerte Thrombozytenaktivierung eine direkte Folge der verringerten NO Menge und führt wiederum selbst zu einer verstärkten Vasokonstriktion und zu Umbauten in der Gefäßwand (G. Muller und Morawietz 2009). Insgesamt ist dadurch der Grundstein zur Entwicklung einer Arteriosklerose gelegt.

Die Arteriosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, beruhend auf einer Dysfunktion der Gefäßwand (Grundtman und Wick 2011). Bevor der zugrunde liegende Pathomechanismus genauer beschrieben werden kann, sollen zunächst wesentliche Mediatoren dieser Entzündungsreaktion erläutert werden. Dabei stehen die neutrophilen Granulozyten, deren Enzym, die Myeloperoxidase (MPO), sowie Nikotin als aktivierendes Molekül, im Fokus der wissenschaftlichen Bemühungen.

1.3 Der neutrophile Granulozyt

Granulozyten gehören wie Monozyten und Lymphozyten zur Gattung der weißen Blutkörperchen, den Leukozyten. Leukozyten unterscheiden sich unter anderem wesentlich von anderen Blutzellen, da sie in der Lage sind, sich durch Migration aktiv und zielgerichtet fortzubewegen. Zirka 63 % der Blutleukozyten sind Granulozyten. Die Granulozyten enthalten allesamt Sekretionsvesikel, sogenannte Granula, die sich beim histologischen Anfärben verschiedenfarbig darstellen lassen. Je nach „Farbe“ der Granula unterteilt man die Granulozyten in die Gruppe der neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten. Fast alle Granulozyten (95%) sind neutrophile, genauer gesagt polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN). Granulozyten sind wichtig

für die unspezifische, angeborene Immunabwehr. Sie infiltrieren das von Krankheitserregern, den sogenannten Pathogenen, befallene Gewebe und produzieren mittels des Enzyms NADPH-Oxidase das Superoxid aus molekularem Sauerstoff. Dieses wird durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt und dient Myeloperoxidase (MPO), einem weiteren Enzym der Granulozyten, als Substrat für die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, um die Pathogene abzuwehren.

Um aus dem Gefäßsystem auszuwandern und in das betroffene Gewebe eindringen zu können, bilden Granulozyten auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren aus. Darüber können sie sich mit dem Endothel der Gefäßwand verbinden und sich auf dessen Oberfläche fortbewegen oder Signalkaskaden aktivieren. Den ersten Schritt dieser Interaktion bildet das sogenannte „Rollen“. Dabei kommt es zu einer Interaktion zwischen speziellen Adhäsionsmolekülen, den Selektinen. Man unterscheidet drei wesentliche Selektine: Die E-Selektine, welche auf dem Endothel zu finden sind, P-Selektine auf Blutplättchen und Endothelzellen und die L-Selektine auf den Leukozyten. Die Selektine vermitteln den ersten Schritt der Interaktion, indem sie zuckerhaltige Proteine und Lipide auf Zelloberflächen erkennen. Ein Beispiel für ein solches Zuckermolekül ist das Tetrasaccharid Sialyl-LewisX (sLe^x). Auf diese Weise kann der Granulozyt über das Endothel „rollen“, ohne abgetrieben zu werden oder zu fest haften zu bleiben. Das „Rollen“ ermöglicht den Zellen, weitere Adhäsionsmoleküle, die Chemokine, zu erkennen, was wiederum zur Aktivierung von Integrinen führt. Integrine bilden eine weitere Gruppe spezieller Oberflächenmoleküle des Granulozyten, die für die feste Adhäsion zuständig sind (W. A. Müller 2013). Beispielhaft sind die Integrine CD11b/CD18, die mit dem Endothelmolekül ICAM-1 eine derartige, feste Verbindung eingehen (Bloemen, Henricks, und Nijkamp 1997). Dieser festen Bindung folgt die Transmigration, beziehungsweise Durchwanderung des Endothels. Dabei gelangt der Granulozyt durch das Endothel in den subendothelialen Raum (Choi, Santoso, und Chavakis 2009; Woodfin, Voisin, und Nourshargh 2010). Dort angekommen, können sich die Granulozyten weiterhin aktiv fortbewegen und an den Bestimmungsort dirigiert werden, indem sie einem Gradienten aus Chemokinen, wie dem Interleukin 8 (IL-8) folgen. Man spricht dann von der sogenannten Chemotaxis. Dabei durchwandern sie den subendothelialen Raum durch stetige Veränderungen ihres Zytoskeletts, was einer kriechenden Bewegung gleich kommt. Essentiell dafür ist das granulozyteneigene

Protein, F-(Filament)Aktin, die polymere Form des zellulären Strukturproteins Aktin. Ist ein Pathogen erreicht, wird es in spezielle Vesikel, den sogenannten Phagosomen, aufgenommen und durch die dort vorhandenen reaktiven Moleküle vernichtet. Allerdings werden bei diesem Prozess diese reaktiven Spezies und Enzyme, allen voran das Enzym Myeloperoxidase, auch in die Umgebung der Zelle abgegeben und so das umliegende körpereigene Gewebe angegriffen. Außerdem produzieren die neutrophilen Granulozyten Moleküle, wie Leukotriene, die eine proinflammatorische Wirkung besitzen und eine Entzündungsreaktion begünstigen. Das bereits angesprochene Enzym Myeloperoxidase nimmt eine zentrale Rolle innerhalb der Entwicklung der Endotheldysfunktion ein und soll deshalb genauer erläutert werden.

1.4 Myeloperoxidase

Myeloperoxidase gehört, wie die Lactoperoxidase oder die eosinophile Peroxidase, zur Gruppe der Säugetierperoxidasen (Deby-Dupont u. a. 1998). Myeloperoxidase mit seiner markant grünen Farbe, konnte unter anderem in Leukozyten, Monozyten und Gewebsmakrophagen sowie in hepatischen Kupferzellen (Brown, Brunt, und Heinecke 2001) und im Mesoglia des zentralen Nervensystems (P. S. Green u. a. 2004) nachgewiesen werden. Der größte Anteil findet sich jedoch in den neutrophilen Granulozyten, wo es in azurophilen Granula gespeichert wird und etwa 5% des Gesamtproteins der Zelle ausmacht (Lau und Baldus 2006). Bei der Aktivierung des Granulozyten werden MPO und andere Enzyme aus den azurophilen Granula in die Umgebung der Zelle freigesetzt.

Der neutrophile Granulozyt ist ein wesentlicher Bestandteil der Immunabwehr. So wurde auch Myeloperoxidase anfangs hauptsächlich als bakterizides Instrument der Pathogenabwehr angesehen, da es in der Lage ist, reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffspezies zu produzieren. Jedoch kommt es interessanter Weise bei Patienten mit einem genetischen Mangel an MPO nur geringfügig zu einer erhöhten Infektionsanfälligkeit (Lanza 1998). Demnach ist es wahrscheinlich, dass sich MPO neben der Immunabwehr an weiteren, möglicherweise pathophysiologischen Mechanismen beteiligt. So scheint MPO unter anderem auch an der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt zu sein, indem es proinflammatorische Wirkungen entfaltet und zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion beiträgt.

Nach der Freisetzung innerhalb des Gefäßsystems kann MPO frei im Blutkreislauf zirkulieren und aufgrund von Ladungsunterschieden an die Oberfläche der Endothelzellen binden. Dadurch ist MPO in der Lage, seine katalytische und proinflammatorische Wirkung auch ohne die direkte Anwesenheit des neutrophilen Granulozyten zu entfalten (Buffon u. a. 2002; Lau und Baldus 2006). MPO ist ein stark positiv geladenes Protein, welches mit den negativ geladenen Heparansulfat-Glycosaminoglycanen (GAG) der Glykokalix auf der Oberfläche der Gefäßwand interagieren kann und so an diese gebunden wird (Daphna u. a. 1998). Dabei spielt Albumin wohl eine vermittelnde Rolle zwischen Endothel und MPO (Tiruppathi u. a. 2004). Mittels Transzytose, einem hochselektiven Transport durch die Zellmembran der Endothelzellen, gelangt MPO schließlich auf die subendotheliale Seite, wo es mit hoher Affinität zu dem extrazellulären Matrix-Protein Fibronectin akkumuliert (S Baldus u. a. 2001). Auf Grund seiner speziellen katalytischen Fähigkeiten kann es die Struktur und Funktion extrazellulärer Matrix-Proteine beeinflussen und verändern, sowie die Bioverfügbarkeit von NO reduzieren.

1.4.1 Chemische Struktur

Die Primärstruktur des Enzyms besteht im Wesentlichen aus einem 140 kDa schweren Homodimer, das sich aus zwei Monomeren zusammensetzt. Jedes Monomer besteht wiederum aus einer schweren (55-64 kDa) und einer leichten (10-15 kDa) Untereinheit und beherbergt jeweils ein kovalent gebundenes Häm-Zentrum (Akin und Kinkade 1986; Koeffler, Ranyard, und Pertcheck 1985).

Die Sekundärstruktur ist überwiegend alpha-helical. Jedes Monomer wird von einem Zentrum aus fünf Helices und der Häm-Gruppe gebildet. Vier dieser Helices bestehen aus einem großen Polypeptid, die Fünfte aus einem kleinen Polypeptid (Zeng und Fenna 1992). Eine strukturelle Besonderheit des MPO ist eine zusätzliche, dritte kovalente Bindung zwischen einem Schwefelatom und dem Pyrolring, die es dem Enzym ermöglicht, hypochlorige Säure zu bilden (Fenna, Zeng, und Davey 1995; Taylor u. a. 1995).

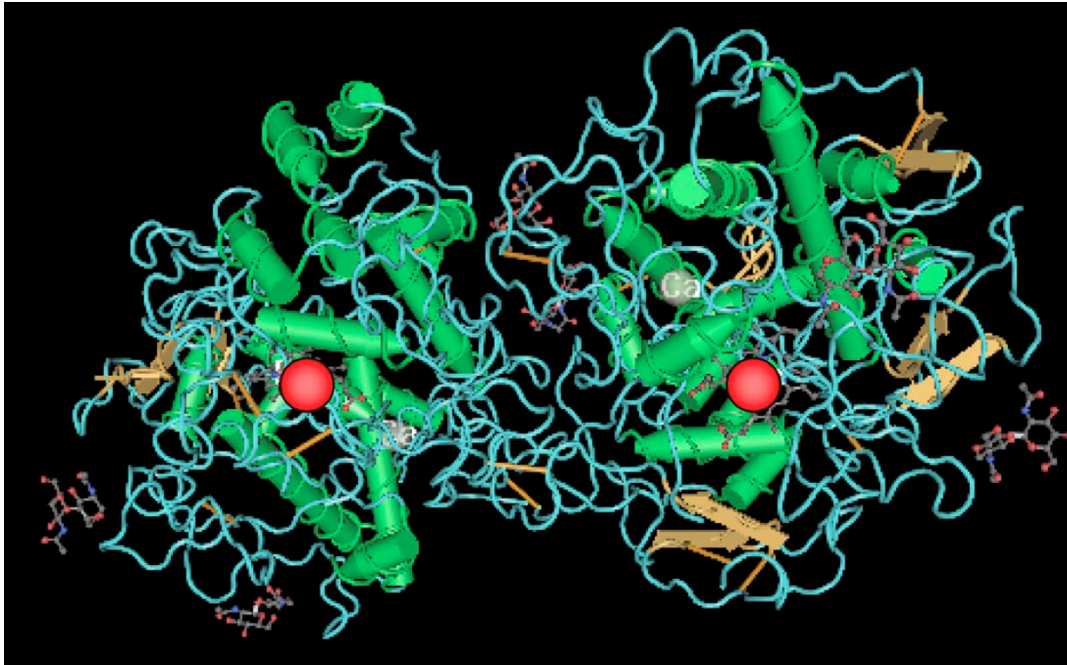


Abb. 2: Räumliche Darstellung des Myeloperoxidase-Homodimers. Die Häm-Zentren sind rot dargestellt, die α -Helices grün und die β -Faltblattstrukturen gelb. Modifiziert nach (Lau und Baldus 2006), Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease, *Pharmacology and Therapeutics* 111, 16-26, 2006

1.4.2 Katalytische Aktivität: das MPO System

Myeloperoxidase gehört zur Familie der Oxidasen. Oxidasen sind Teil eines Redoxsystems und katalysieren die Redoxreaktion. Dabei wird neben einer Reduktion gleichzeitig eine Oxidation ausgeführt. Um seine katalytische Aktivität entfalten zu können, benötigt MPO neben seinem Hauptsubstrat Wasserstoffperoxid (H_2O_2), weitere oxidierbare Cosubstrate. Diese Redoxreaktion läuft im Wesentlichen in zwei aufeinander folgenden Schritten ab. Dabei lässt sich der zweite Schritt weiter unterteilen.

Schritt 1

Ausgehend vom Grundzustand (MPO-Fe(III)), wird das Hauptsubstrat H_2O_2 über eine 2e- Übertragung zu Wasser (H_2O) reduziert und das ehemals dreiwertige Eisen (Fe III) des Häm-Zentrums in ein vierwertiges Eisen (Fe IV) überführt. MPO bildet in diesem Zustand einen instabilen und damit kurzlebigen Komplex, das sogenannte Compound I (MPO-I), das ein Radikal beherbergt (Everse 1998; Kettle, van Dalen, und Winterbourn 1997).

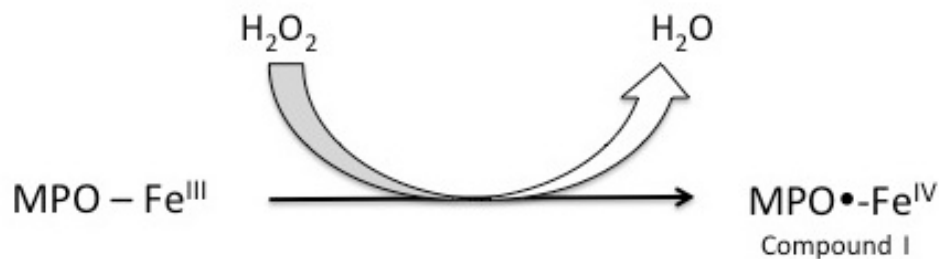


Abb. 3: Schritt 1 der Redoxreaktion. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird zu Wasser (H_2O) reduziert

Schritt 2

Ausgehend von der Oxidationsstufe I, oder Compound I, können in der nun folgenden rückläufigen Reaktion hin zum Grundzustand entweder 2 Elektronen gleichzeitig übertragen beziehungsweise zurückgeführt werden oder jeweils ein Elektron in zwei aufeinander folgenden Schritten. Hierbei werden verschiedene Cosubstrate wie Nitrit (NO_2^-) oder auch Pseudohalogenide oder Halogenide wie Chlorid (Cl^-), Bromid (Br^-) oder Iodid (I^-) oxidiert. Chlorid stellt dabei, auf Grund seiner höheren Konzentration im Gewebe vermutlich den Hauptreaktionspartner dar (Fliss 1988).

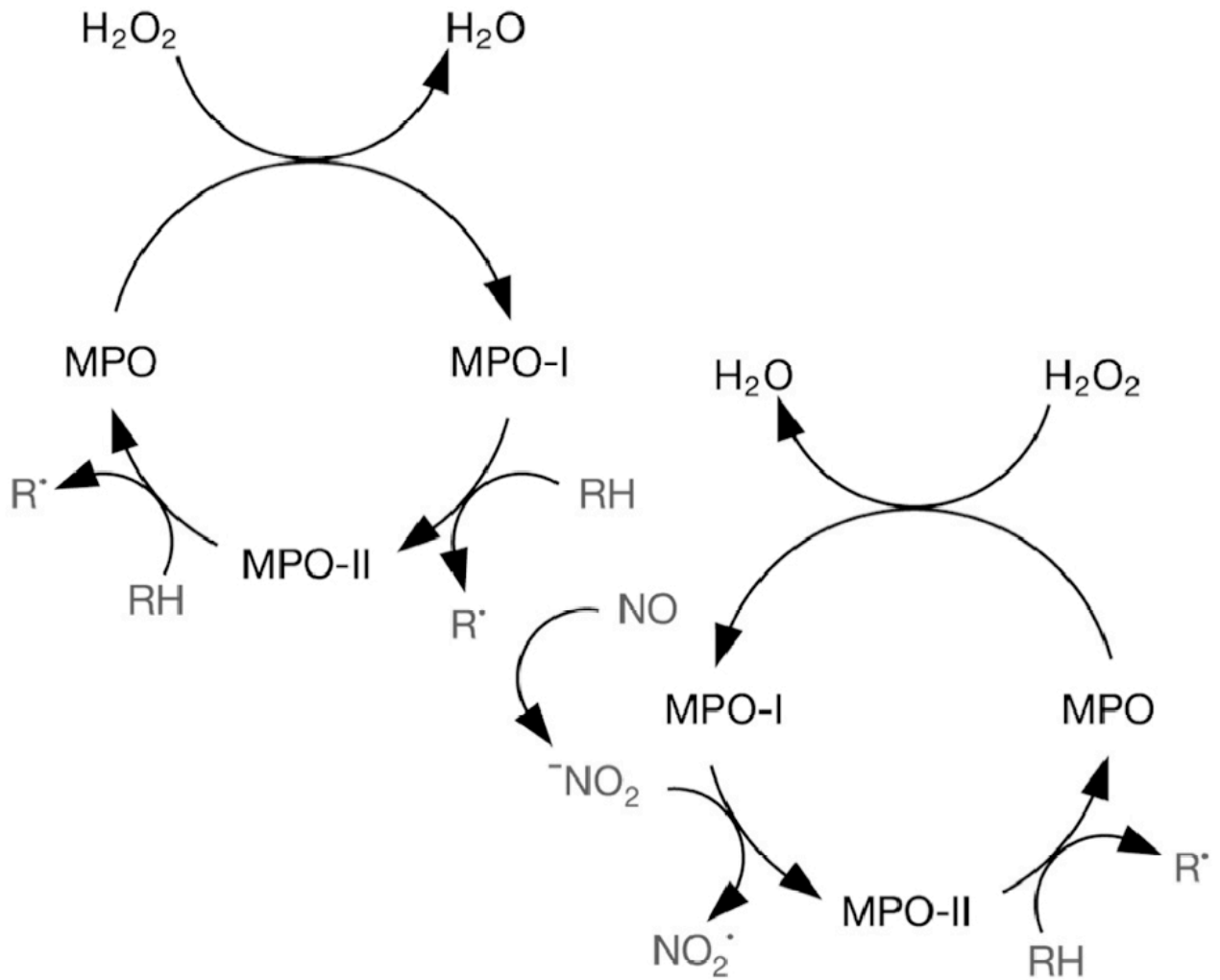


Abb. 4: Das katalytische System des Enzyms MPO. MPO = Myeloperoxidase; MPO-I = Myeloperoxidase Compound I; MPO-II = Myeloperoxidase Compound II; NO = Stickstoffmonoxid; H_2O_2 = Wasserstoffperoxid; NO_2^- = Nitrit; NO_2^\bullet = Stickstoffdioxid; RH = Substrat; R^\bullet = Radikales Zwischenprodukt.

1.4.2.1 HOCL Produktion

In der einstufigen Rückreaktion wird Chlorid zu Hypochlorit (HOCl) oxidiert, einem Oxidationsmittel, welches selbst eine stark toxisch Wirkung gegenüber Bakterien und Viren, aber auch dem eigenen Gewebe gegenüber aufweist (J P Eiserich u. a. 1998).



Abb. 5: Schritt 2 der Redoxreaktion. In der einstufigen Rückreaktion wird Chlorid zu Hypochlorit (HOCl) oxidiert.

HOCl ist ein potentes Chlorierungsmittel, das die Funktion von Biomolekülen durch die Übertragung von Chlor verändern kann (Malle u. a. 2000; C. Zhang u. a. 2003). So kann beispielsweise die Aminosäure L-Arginin chloriert werden, die das Substrat der eNOS zur NO-Generierung darstellt. Dadurch steht L-Arginin nicht mehr als Substrat zur Verfügung und die Bioverfügbarkeit von NO nimmt ab (C. Zhang u. a. 2003).

Bei der angesprochenen Rückreaktion in zwei Schritten wird Compound I vor dem Erreichen des Grundzustandes erst zu Compound II (MPO II) reduziert. Dabei verliert es seine Fähigkeit zur weiteren Reaktion mit Halogeniden. Der letzte Schritt, von Compound II zum Grundzustand, ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt des Redoxsystems. Hierbei können Superoxid, Tyrosin oder Ascorbinsäure als Substrate (RH) genutzt werden (Deby-Dupont u. a. 1998; Kettle, van Dalen, und Winterbourn 1997).

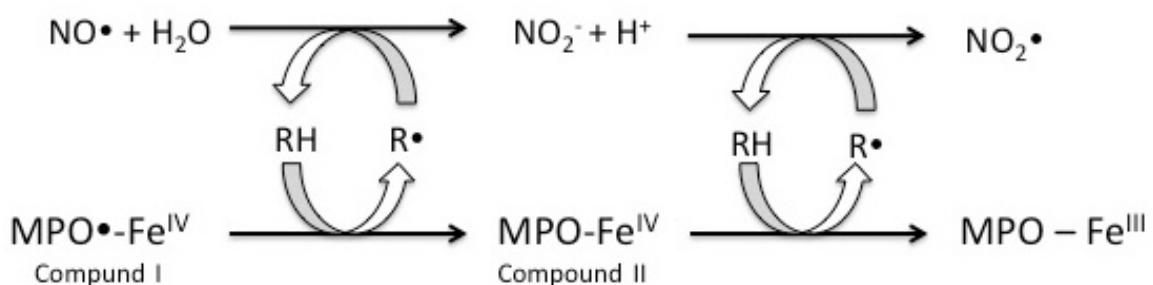


Abb. 6: Schritt 2 der Redoxreaktion. Rückreaktion in zwei Schritten.

Folglich wird angenommen, dass MPO aus dem eben erwähnten Tyrosin oder Ascorbat kleine radikale Zwischenprodukte ($R\bullet$) erzeugt, die dann NO zu NO_2^- und NO_2^- weiter zu Stickstoffdioxid ($NO_2\bullet$) oxidieren (Lau und Baldus 2006). $NO_2\bullet$ ist ein höchst instabiles Radikal und selbst in der Lage, andere Proteine zu nitrieren und Lipide zu oxidieren (Hazen u. a. 1999; Jason P Eiserich u. a. 2002; J P Eiserich u. a. 1998). Compound I kann auch NO als Substrat nutzen und zu Nitrit (NO_2^-) oxidieren (Abu-Soud und Hazen 2000b; Jason P Eiserich u. a. 2002). Dieser Vorgang ist unter physiologischen Bedingungen jedoch unwahrscheinlich, da andere Substrate wie Tyrosin oder Ascorbat in sehr viel höheren Konzentrationen vorliegen.

1.4.2.2 Nitrierung

$NO_2\bullet$ ist wie bereits erwähnt, in der Lage, andere Proteine zu nitrieren. Die Nitrierung von freiem und proteingebundenem Tyrosin (Tyr) führt beispielsweise zur Bildung von Nitrotyrosin (NO_2 Tyr), einem klinischen Marker für entzündliche Gewebeschäden, der bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen zu finden ist (Ischiropoulos 1998).

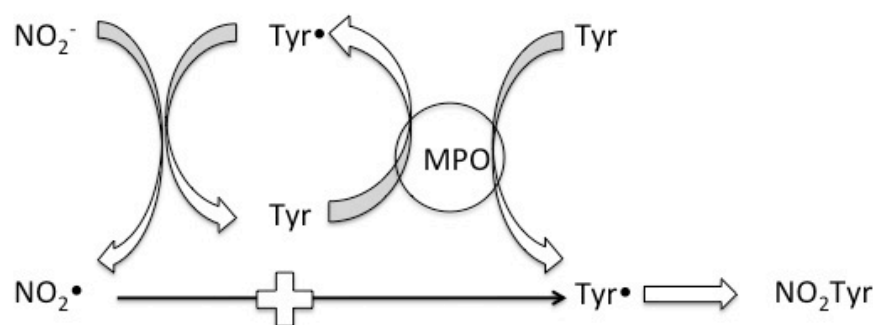


Abb. 7: Nitrierung von Tyrosin (Tyr) führt zur Bildung von Nitrotyrosin (NO_2 Tyr),

Die Tyrosin-Nitrierung kann durch eine Veränderung der Protein-Struktur auch eine Funktionsänderung bewirken. So führt beispielsweise die Tyrosin-Nitrierung des Fibrinogens zu einer vermehrten Plättchenaggregation (Vadseth u. a. 2004). Durch die räumliche Beziehung des MPO zu Fibronectin im subendothelialen Raum, ist Fibronectin vermutlich direkt von der Tyrosin-Nitrierung betroffen. Die Konsequenzen dieser Modifikation sind weitreichend und betreffen die Regulation der Proliferation

von Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur ebenso wie die Plättchenaggregation und eine Vielzahl an Signalkaskaden, die in ihrer Summe alle zur Entstehung eines proinflammatorischen Milieus beitragen (S Baldus u. a. 2001; Stephan Baldus u. a. 2002).

1.4.2.3 Oxidation

Ein wesentlicher Mechanismus, der zur Entwicklung der endothelialen Dysfunktion beiträgt, ist die Oxidation von Stickstoffmonoxid. NO wird, wie oben beschrieben, durch MPO oxidiert und dabei verbraucht. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Senkung der Bioverfügbarkeit von NO durch Oxidation in einem physiologisch relevanten Ausmaß passiert (Jason P Eiserich u. a. 2002). Ein nicht unerheblicher Grund dafür mag die gemeinsame Lokalisation im subendothelialen Raum, zwischen Muskelzellen und Endothel, sein (Lau u. a. 2005). Wenn man davon ausgeht, dass MPO einen wesentlichen Mechanismus für die Reduzierung der Bioverfügbarkeit von NO bereitstellt, liegt es nahe, dass MPO durch den Verbrauch des NO auch dessen Signalkaskaden und antiinflammatorische Funktionen maßgeblich beeinflusst (Abu-Soud und Hazen 2000a; Abu-Soud und Hazen 2000b). Ein weiterer Weg von MPO, die Bioverfügbarkeit von NO zu reduzieren, ist die Oxidation von Lipoproteinen, wie LDL und HDL, was dazu führt, dass sich die eNOS von der Plasmamembran löst und nichtmehr für die NO-Produktion zu Verfügung steht (Marsche u. a. 2004). Darüber hinaus, führt die Oxidation und Nitrierung von LDL (Hazen u. a. 1999) zu einer vermehrten Ablagerung und Aufnahme in Makrophagen (Exner u. a. 2004; Schmitt u. a. 1999) und fördert so die Schaumzellbildung.

Neben seiner bereits belegten Rolle als Lieferant reaktiver Sauerstoffspezies für die Immunabwehr, wurde durch die Aufdeckung der katalytischen Eigenschaften deutlich, dass MPO auch bei der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion eine wichtige Rolle spielt und dadurch zur Initiierung und zum Fortschreiten der Arteriosklerose beiträgt.

1.5 Nikotin

Mit der Beschreibung der Endothelfunktion, den neutrophilen Granulozyten, sowie Myeloperoxidase, wurden bisher die zellbiologischen Grundlagen vermittelt, die notwendig sind, um die Pathogenese der Arteriosklerose zu verstehen. Nun soll der zentrale Effektor, das Nikotin, als wesentliches Molekül der Arterioskleroseinitiierung innerhalb unserer Hypothese vorgestellt werden.

1.5.1 Allgemeine Informationen

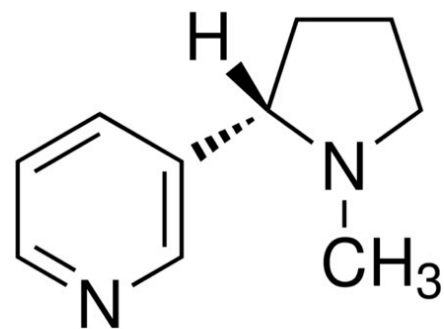
Nikotin, benannt nach dem französischen Diplomaten Jean Nicot, ist ein basisches, stickstoffhaltiges Hauptalkaloid der Tabakpflanze, welches in den Wurzeln gebildet und als natürliches Insektizid in den Blättern der Pflanze gespeichert wird. Neben Nikotin, enthält die Tabakpflanze etwa 4500 weitere Inhaltsstoffe, von denen hier nur einige wenige genannt werden sollen. So sind in der Pflanze die nachweislich krebserregenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, N-Nitrosamine und aromatischen Amine enthalten. Weitere Stoffe sind unter anderen Formaldehyd, Benzol und anorganische Verbindungen wie Kohlenmonoxid, Cyanid, Arsen und Cadmium (Haustein und Groneberg 2008). Der Zigarettentabak enthält darüber hinaus mehr als 600 verschiedene Zusatzstoffe, die in der industriellen Herstellung beigemischt werden (D. Green und Rodgman 1996; Doull u. a. 1994). Bei dem Rauchen der Zigarette entstehen durch das Verglühen, also mittels Pyrolyse, weitere chemische Verbindungen, welche in der Gesamtheit umgangssprachlich als Teer bezeichnet werden.

Nikotin ist für den menschlichen Körper toxisch und bereits ab einer Menge von 0,9 mg/kg (oder etwa 60 mg) tödlich (Haustein und Groneberg 2008). Nikotin führt zur Entwicklung einer Abhängigkeit (Henningfield und Keenan 1993) und wird in Deutschland wegen seiner psychotropen Wirkeigenschaften der Gruppe der Drogen zugeordnet. Nikotin besitzt eine chirale chemische Struktur, wobei das natürlich vorkommende (S)-Nikotin die wesentliche pharmakologische Wirkung besitzt, wohingegen das Enantiomer (R)-Nikotin, welches durch Racemisierung bei der Verbrennung entsteht, nur eine sehr geringe Wirkung aufweist. Das innerhalb der hier beschriebenen Versuche verwendete Nikotin ist eine freie Base, mit einem Molekulargewicht von $162,23 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ und liegt bei Raumtemperatur als bräunliche Flüssigkeit vor (Matta u. a. 2007). Der Gehalt an R-Nikotin beträgt etwa 0,1-1,2%

(Hukkanen, Jacob, und Benowitz 2005b). Die Eigenschaft, als eine freie Base vorzuliegen, ist pH-abhängig (Blackhurst 1966; Willimas 1971) und entscheidend für die Wirkung des Nikotin. Die freie Base kann in ihrer unionisierten Form die Biomembranen menschlicher Zellen schnell und einfach passieren, wohingegen das als Salz vorliegende Nikotin (Ammoniumchlorid) nur sehr langsam aufgenommen wird.

1.5.2 Nikotin in Zigaretten

Nikotin wird meist als Bestandteil des Zigarettenrauchs inhaled. Zigarettenrauch ist eine Mischung aus mehr als 5000 unter anderem toxischen und/oder karzinogenen Stoffen (Borgerding und Klus 2005; Thielen, Klus, und Müller 2008; Hoffmann und Hoffmann 1997). Jede Zigarette enthält in etwa 0.8 bis 1.9 mg Nikotin, wobei ein



(S)-Nikotin

Abb. 8: (S)-Nikotin, modifiziert nach Hukkanen et al; Metabolism and Disposition of Nicotine in Pharmacological Reviews, Vol 57, No.1, 79-115, 2005

großer Teil des Nikotins bereits vor der Inhalation verbrennt. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht (KG) von 68 kg wird mit einer einzigen Zigarette eine Menge von 10 – 30 µg /kg KG Nikotin aufgenommen, welche im Blut einen Plasmaspiegel von etwa 10 bis 50 ng/ml Plasma (0.31 µM) erreichen kann (Matta u. a. 2007). Direkt nach der Inhalation des Zigarettenrauchs gelangt ein Teil des Nikotins schnell über das Alveolarepithel der Lunge in den Blutkreislauf. Dabei kann es für kurze Zeit zu Höchstwerten im arteriellen Blut direkt hinter dem linken Herzen von 100 ng/ml (0,6 µM) kommen (Henningfield u. a. 1993; Hukkanen, Jacob, und Benowitz 2005b; Schneider u. a. 2001). Von dort aus verteilt es sich im ganzen Körper, wobei beispielsweise die Werte im Skelettmuskel denen im Plasma entsprechen (N. Benowitz, Porchet, und Jacob 1990).

1.5.3 Nikotin-Metabolismus in Menschen und Säugetieren

In das Blut aufgenommen, liegt Nikotin dort zu 25% als nicht ionisierte, freie Base vor und wird schnell von der Leber verstoffwechselt und in Haupt- und Nebenprodukte verarbeitet. Dabei ist Cotinin mit etwa 75% das mengenmäßig häufigste Abbauprodukt und stellt im Menschen und u.a. Mäusen den ersten Schritt des Abbauweges dar (Groneberg und Haustein 2008). In der Leber ist ein Cytochrom P 450 Enzym, das CYP2A6, für die Metabolisierung verantwortlich. Dabei variiert die Geschwindigkeit des Stoffwechsels individuell von Mensch zu Mensch (Swan u. a. 2005). Die Enzyme des Menschen sind denen der Maus dabei homolog. Der *First Pass Effekt* ist mit annähernd 70 % so hoch, dass bei einer intraperitonealen oder oralen Verabreichung nur noch etwa 30 % des verabreichten Nikotins den systemischen Blutkreislauf erreichen. Über die Nieren werden etwa 7% unverändert ausgeschieden. Im Blutkreislauf des Menschen hat das Nikotin eine Halbwertszeit von 2 Stunden (Hukkanen, Jacob, und Benowitz 2005a). Tiere metabolisieren Nikotin wesentlich schneller (Gorrod and Jenner 1975; Scheline 1978) (Seaton und Vesell 1993). So hat Nikotin in der Maus nur eine relativ kurze Plasma-Halbwertszeit von 6-7 Minuten.

Neben der Gattung und den Enzymsystemen, beeinflussen auch Faktoren wie das Alter oder das Geschlecht den Metabolismus. So läuft der Stoffwechsel bei Frauen schneller ab als bei Männern (N. L. Benowitz u. a. 2006) und im Alter ist der Metabolismus gegenüber jungen Individuen verlangsamt (Molander, Hansson, und Lunell 2001). Auch Stress hat einen beschleunigenden Einfluss auf die Metabolisierung, dies gilt insbesondere für den Tierversuch.

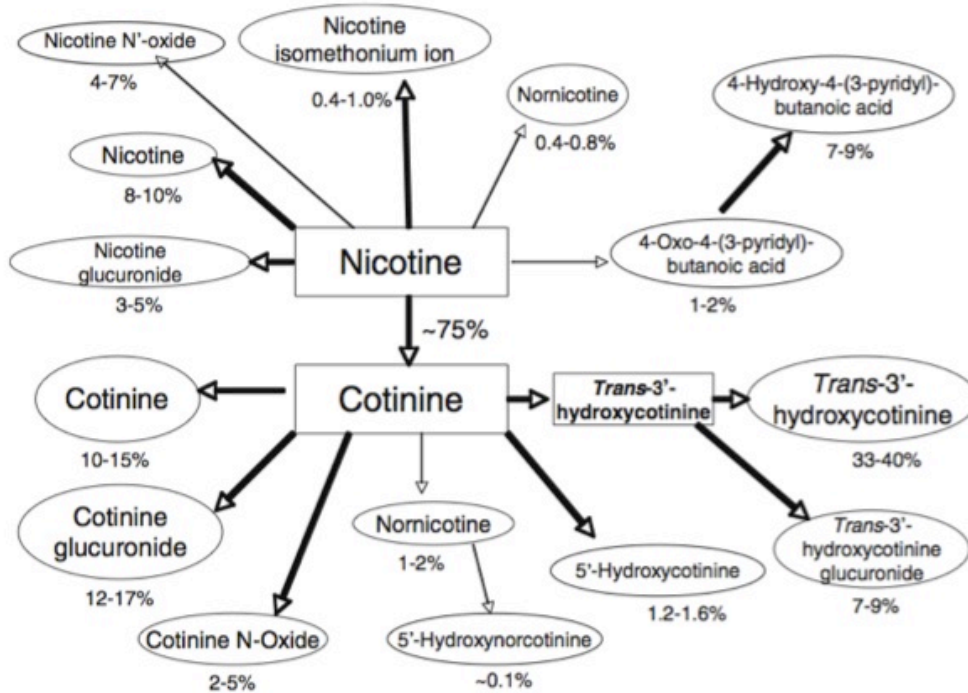


Abb. 9: Quantitatives Schema des Nikotin-Metabolismus basierend auf Schätzungen der mittleren Ausscheidung der Nikotin-Metaboliten, angegeben als Prozent des gesamten Nikotins im menschlichen Urin; Modifiziert nach Hukkanen et al; Metabolism and Disposition of Nicotine in Pharmacological Reviews, Vol 57, No.1, 79-115, 2005

1.5.4 Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor (nAChR)

Es existieren zwei Haupttypen des Acetylcholin-Rezeptors. Der muskarinische und der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR). Beide sind membranständige, ligandgesteuerte Ionenkanäle. Dieser Rezeptortyp ist ein zylindrisches Transmembranprotein, welches eine pentamere Struktur besitzt und im Allgemeinen von zwei α -Untereinheiten sowie einer β -, γ - und δ -Untereinheit gebildet wird (Karlín 1993; McGehee und Role 1995).

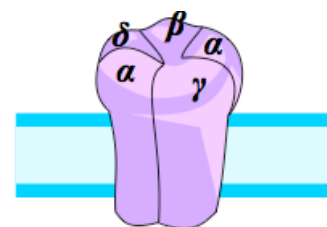
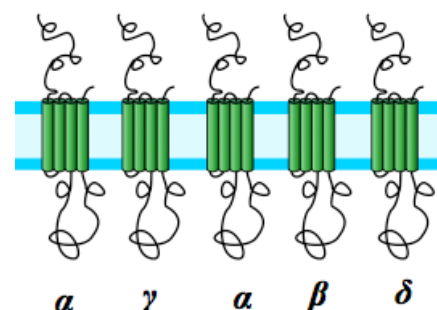


Abb. 10: Schematische Darstellung des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors; Modifiziert nach: nikotinischer ACh-Rezeptor, Peter Wolber, 2005-09-20, Transferred from de.wikipedia, Licensed under the GFDL by the author.



Weiterhin unterscheidet man eine hetero- und eine homomere Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten. Insgesamt kennt man bisher 16 verschiedene Isoformen der Untereinheiten ($\alpha 1 - \alpha 10$, $\beta 1 - \beta 4$, γ , δ , ϵ). Abhängig von der Kombination der verschiedenen α - und β -Untereinheiten ergeben sich funktionell unterschiedliche Rezeptorsubtypen, die sich in ihrer Affinität zu dem Liganden, in der Art der Signalübermittlung und in der Selektion der Ionen unterscheiden (Changeux 1995; Conti-Tronconi u. a. 1994). Diese Rezeptoren findet man im Zentralen Nervensystem, auf Muskelzellen, neuroendokrinen Zellen aber auch auf Zellen des Herz-Kreislauf- und Immunsystems. So konnte man bereits spezifische Rezeptorsubtypen des nAChR auf glatten Muskelzellen der Gefäßwand (VSMC), aortalen Endothelzellen, Blutplättchen, B- und T-Lymphozyten, Makrophagen sowie mononukleären und polymorphkernigen Leukozyten identifizieren (J. Lee und Cooke 2011)(Leonard und Bertrand 2001; MacDermott, Role, und Siegelbaum 1999). Im Fall der neutrophilen Granulozyten (PMN) konnten die Rezeptortypen $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 3\beta 4$ identifiziert werden (B.D. Davies et al. 1982, F. Lebargy 1996). Neben Acetylcholin als natürlichen Liganden des nAChR, konnten bereits weitere endogene, allosterische Liganden, wie etwa das Protein SLURP-1 der Keratinozyten ausgemacht werden (Arredondo u. a. 2005; Arredondo u. a. 2006). Aber auch exogene Substanzen, wie das Nikotin und andere, im Tabak enthaltene Nitrosamine können an den Rezeptor binden. Die Menge des gebundenen Nikotins, aber auch die Menge der zu Verfügung stehenden Rezeptoren korreliert dabei mit dem Ausmaß des Tabakkonsums(Benhammou u. a. 2000).

Wenn Nikotin an diesen Rezeptor bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung und somit zu einer Änderung der räumlichen Struktur des Proteins. Dabei entsteht eine zentrale Kanalpore in der Mitte des Rezeptors, durch die Ionen die Zellmembran passieren können. Geladene Aminosäuren an den Rändern der Pore sorgen für eine Selektion der durchtretenden Ionen (Santanam u. a. 2012). So strömen Natrium- und Calcium-Ionen in die Zelle und Kalium-Ionen aus der Zelle heraus. Hierdurch kommt es zu einer Depolarisation der Zelle, wodurch wiederum andere Signaltransduktionen, beispielsweise durch die MAP-Kinasen, Telomerasen oder Calciumionen in Gang gesetzt werden (T. Jacob u. a. 2009; Di Luozzo u. a. 2005; Kanda und Watanabe 2007; Wada u. a. 2007; Vazquez-Padron u. a. 2010)(Zia u. a. 1997).

Mit diesen Grundkenntnissen lässt sich nun die Entwicklung der Arteriosklerose besser verstehen.

1.6 Arteriosklerose

1.6.1 Atherogenese

Die Entstehung der Arteriosklerose ist ein hochkomplexer Mechanismus, der zahlreiche Interaktionen zwischen Zellen des Gefäß- und des Immunsystems bedingt und somit als eine chronisch entzündliche Erkrankung der Arterienwand angesehen werden kann. Sie beruht auf zwei wesentlichen Mechanismen, zum Einen auf einer Läsion der Tunica Intima und zum Anderen auf der Ausbildung von atheromatösen Plaques (Stylianou u. a. 2012). Dabei kommt es auf Grund einer pathologisch erhöhten Permeabilität des Endothels, ein Merkmal der endothelialen Dysfunktion, zur Akkumulation von modifizierten und oxidierten Lipoproteinen, hauptsächlich Low Density Lipoprotein (LDL), in der Tunica Intima und dadurch zur fokalen Verdickungen der Gefäßwand. Monozyten, die über das aktivierte Endothel eingewandert sind, transformieren zu Makrophagen. Dabei bilden sie auf ihrer Oberfläche vermehrt LDL-Rezeptoren aus, die sogenannten Scavenger-Rezeptoren und nehmen große Mengen vor allem des oxidierten LDLs auf. Diese lipidspeichernden Makrophagen werden so zu Schaumzellen (Parthasarathy 1999). Zusammen mit Lymphozyten, freiem Cholesterin und anderen Bestandteilen bilden die Schaumzellen die sogenannten „*fatty streaks*“ unter der Intima und werden über die Zeit zu einem festen Lipidkern, dem Atherom. Diese Vorgänge führen dazu, dass vermehrt Wachstumsfaktoren und Chemokine freigesetzt werden, die wiederum zu einer vermehrten Plättchenaggregation sowie Proliferation und Einwanderung glatter Muskelzellen (VSMC) innerhalb der Tunica intima führen. Die Muskelzellen sondern Proteoglykane, Elastin und Kollagen ab und bilden so fibröse, vaskularisierte Plaques (Doyle und Caplice 2007). Durch weiteres Plaquewachstum kommt es zu einer Verbreiterung und Versteifung der Gefäßwand und konsekutiv zur Einengung des Gefäßlumens, welches letzten Endes das Hauptmerkmal der Arteriosklerose darstellt.

1.6.2 Die Beeinflussung der Atherogenese durch MPO

Die angesprochene endotheliale Dysfunktion, welche die initialen Mechanismen der Atherogenese ermöglicht, wird in der Wissenschaft vermehrt als die primäre Manifestation der Erkrankung angesehen (Parthasarathy 1999). Ausführlich erläuterte Ursache dieser Dysfunktion ist möglicherweise wie oben beschrieben, die Anwesenheit

von MPO im subendothelialen Raum und der durch MPO erzeugte Mangel an NO (Abu-Soud und Hazen 2000b; Jason P Eiserich u. a. 2002).

Darüber hinaus beeinflusst MPO eine Reihe weiterer Geschehen, die an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sind. So trägt sie zur Schaumzellbildung und zum Plaque-Wachstum bei, indem sie wie bereits beschrieben, Lipide wie LDL oxidiert und nitriert (Hazen u. a. 1999). Die Oxidation des Lipoproteins führt wiederum zu einer vermehrten Ablagerung und Aufnahme in Macrophagen (Exner u. a. 2004; Schmitt u. a. 1999). Die Untersuchung von LDL in atherosklerotischen Läsionen ergab einen 100fach erhöhten Wert für oxidiertes LDL gegenüber nicht oxidiertem LDL (Leeuwenburgh, Hardy, u. a. 1997; Leeuwenburgh, Rasmussen, u. a. 1997). Das akut lebensbedrohliche Ereignis innerhalb dieser Erkrankung ist allerdings die Plaquestabilisierung und Ruptur, die zu einer Verschiebung des betroffenen Gefäßes führen kann. Auch hieran ist MPO vermutlich beteiligt. Neben der bereits erwähnten LDL-Oxidierung kann MPO über einen weiteren Mechanismus die Destabilisierung der Plaques erwirken. MPO kann via HOCL Matrixmetalloproteinasen (MMP) aktivieren, die extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagene und Elastine abbauen und so wiederum zur Plaque-Kappen-Destabilisierung und letzten Endes Ruptur beitragen (P Libby 2000; George 2000; Fu u. a. 2001) (Lau und Baldus 2006).

1.6.3 Die Beeinflussung der Atherogenese durch Nikotin

1.6.3.1 Proarteriosklerotische Effekte von Nikotin auf das Herzkreislaufsystem

Nikotin nimmt in vielerlei Hinsicht Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System und trägt zur Entwicklung einer Arteriosklerose bei. Bekanntermaßen führt Rauchen zu einer Erhöhung des Blutdrucks (Tachmes, Fernandez, und Sackner 1978) und der Herzfrequenz, indem Katecholamine ausgeschüttet werden und die NO-Bioverfügbarkeit reduziert wird (J. Lee und Cooke 2011). Nikotin verursacht darüber hinaus eine Zunahme der Serumkonzentrationen von LDL, des Gesamtcholesterins und der Triglyceride im Blut (Craig, Palomaki, und Haddow 1989)(Booyse, Osikowicz, und Quarfoot 1981; Ashakumary und Vijayammal 1997; Chattopadhyay und Chattopadhyay 2008), wobei die Oxidation des LDL durch Rauchen gefördert wird (Scheffler u. a. 1992; Harats u. a. 1989). Zusätzlich wird die Blutplättchen-Aggregation gesteigert (Foo, Roshidah, und Aimy 1991; Marasini u. a. 1986)(Shanker u. a. 2006; Schedel u. a. 2011).

1.6.3.2 Bekannte Nikotineffekte auf das Endothel

Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine Erkrankung der Gefäßwand und deren Wandschichten. Das Endothel erfüllt dabei die zentrale Aufgabe der Interaktion zwischen den beteiligten Zellen. So wird beispielsweise die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten durch Nikotin gesteigert, indem die beteiligten Moleküle vermehrt exprimiert und auf den Zellen präsentiert werden (Kalra u. a. 1994; Blann, Steele, und McCollum 1997; Shen u. a. 1996)(Albaugh u. a. 2004).

Genauer gesagt kommt es neben der Produktion von adhäsionssteigernden Zytokinen wie den Chemokinen (Vassallo u. a. 2008), den Interleukinen (v.a. IL- β) und Tumornekrosefaktoren (v.a. TNF α) (Santanam u. a. 2012), zur gesteigerten Expression von E- und P-Selektinen (Stone u. a. 2002), sowie des intrazellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) und des vaskulären Adhäsionsmoleküls (VCAM-1) (Shen u. a. 1996)(Cooke 2007; Cooke und Bitterman 2004; Heeschen, Weis, und Cooke 2003). Dadurch werden die einzelnen Schritte der Migration (Rolling - feste Adhäsion - Transmigration) gefördert (Yong, Zheng, und Linthicum 1997). Außerdem führt Nikotin zu einer verminderten Verfügbarkeit von NO in der Gefäßwand. Dies geschieht unter anderem über die Superoxidbildung durch Nikotin, welches wiederum NO zu Peroxynitrit oxidieren kann (Cai und Harrison 2000; Heitzer, Just, und Münzel 1996).

1.6.3.3 Bekannte Nikotineffekte auf neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen

Rauchen erzeugt eine inflammatorische Reaktion im Gefäßsystem des Rauchers (Overbeek u. a. 2011). Bekanntermaßen kommt es bei Rauchern zu einer erhöhten Anzahl der im Blut zirkulierenden Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Freedman u. a. 1996; Parry u. a. 1997; Terashima u. a. 1997). Nikotin ist nachweislich in der Lage, neutrophile Granulozyten zu rekrutieren (Iho u. a. 2003), zu aktivieren und diese chemotaktisch zu dirigieren (Totti u. a. 1984), sowie die Sensibilität der Zellen gegenüber anderen chemotaktisch wirksamen Stoffen zu erhöhen (Nowak, Ruta, und Piasecka 1990). Einen indirekten Nachweis der Granulozyten-Aktivierung durch Nikotin liefern erhöhte MPO Plasmaspiegel im Blut von Probanden nach Nikotineinnahme (Rudolph u. a. 2011). Nikotin kann neben der Freisetzung von MPO auch die

Sezernierung der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) aus Granulozyten bewirken (Xu u. a. 2008). Diese kann extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen und Elastine abbauen und so wiederum zur Plaquekappen-Destabilisierung und letzten Endes Ruptur beitragen (P Libby 2000; George 2000; Fu u. a. 2001). Nikotin ist ebenso in der Lage, die F-Aktin-Produktion der neutrophilen Granulozyten und somit deren Chemotaxisvermögen zu steigern (Ryder 1994), sowie die Granulozyten zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies anregen (Gillespie u. a. 1987). Die Effekte von Nikotin beschränken sich innerhalb der Leukozyten nicht auf die Granulozyten sondern haben auch vielfältige Auswirkungen auf weitere Immunzellen, wie die dendritischen Zellen. So steigert Nikotin beispielsweise die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-10, IL-12) innerhalb der dendritischen Zellen und unterstützt somit die T-Zell-Aktivierung (Aicher u. a. 2003).

1.6.3.4 Bekannte Nikotineffekte auf VSMCs

Die Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen innerhalb der Tunica media ist ein zentrales Element der Plaque-Bildung und der Verengung des Gefäßlumens. Es konnte gezeigt werden, dass Nikotin hierbei eine deutlich proatherogene Rolle spielt. So fördert Nikotin die Chemotaxis und Migration der glatten Muskelzellen in die Tunica media (Li u. a. 2004; Di Luozzo u. a. 2005; Kanda und Watanabe 2007; Stein u. a. 2011). Dort verursacht Nikotin nicht nur die Hyperplasie (Cucina, Sapienza, Corvino, Borrelli, Randone, u. a. 2000; Cucina, Sapienza, Corvino, Borrelli, Mariani, u. a. 2000) und die Proliferation der Zellen, sondern hemmt auch deren Apoptose (Cucina, Sapienza, Corvino, Borrelli, Randone, u. a. 2000; Stein u. a. 2011). Viele dieser Effekte werden durch Wachstumsfaktoren oder MAP-Kinase-Wege vermittelt und beruhen auf der Aktivierung des nACh-Rezeptors (Doyle und Caplice 2007; Di Luozzo u. a. 2005; Kanda und Watanabe 2007; Cucina, Sapienza, Corvino, Borrelli, Randone, u. a. 2000; Cucina, Sapienza, Corvino, Borrelli, Mariani, u. a. 2000; Wada u. a. 2007; Vazquez-Padron u. a. 2010)

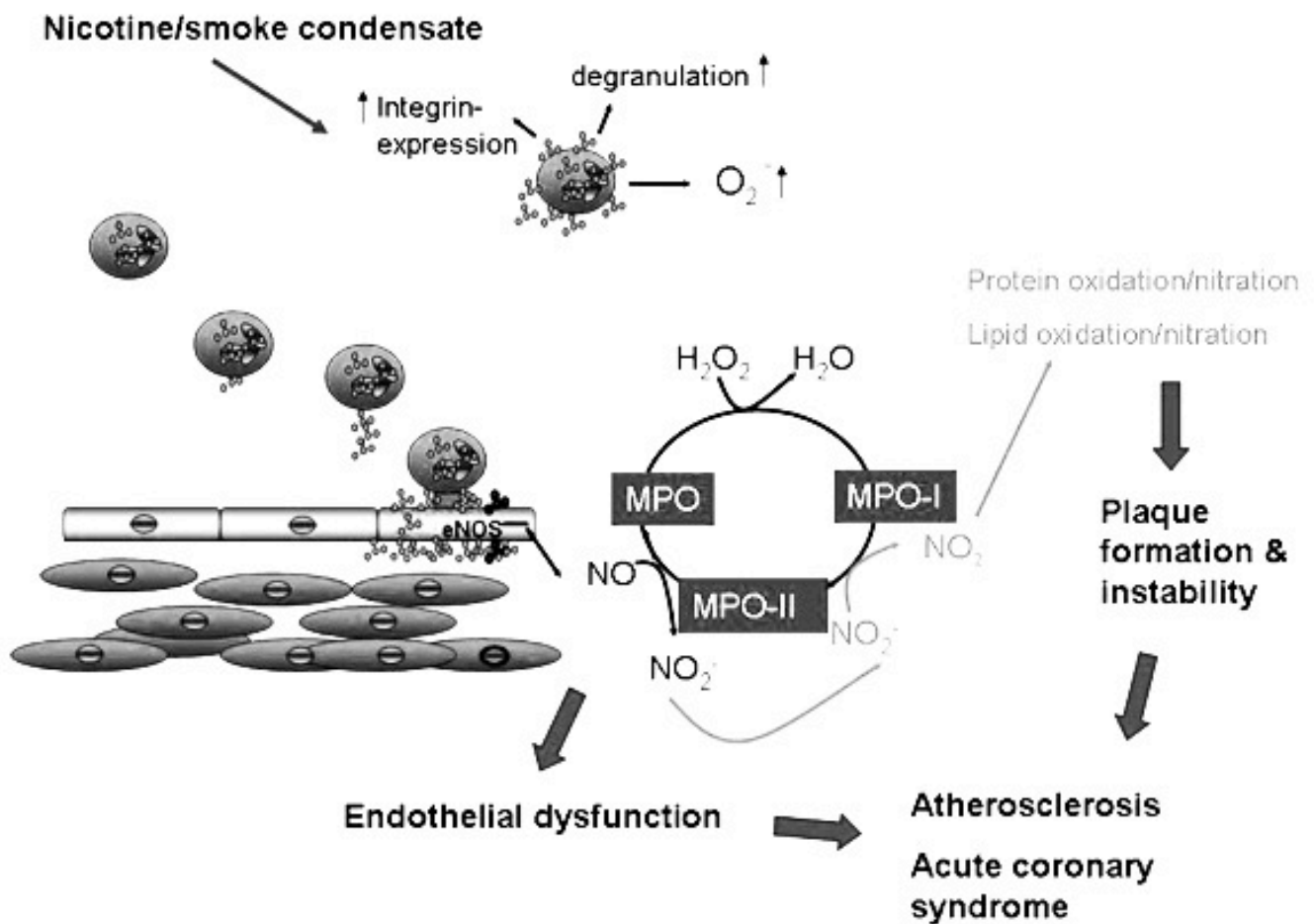


Abb. 11: Die Abbildung zeigt die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch Nikotin/Rauchkondensat und dessen Auswirkungen auf die Gefäßwand. MPO = Myeloperoxidase; MPO-I = Myeloperoxidase Compound I; MPO-II = Myeloperoxidase Compound II; NO = Stickstoffmonoxid; H₂O₂ = Wasserstoffperoxid; NO₂⁻ = Nitrat; ·NO₂ = Nitrogendioxid; O₂⁻ = Superoxid; Modifiziert nach (Rudolph, Rudolph, und Baldus 2008) Contribution of Myeloperoxidase to Smoking-dependent Vascular Inflammation, Proc Am Thorac Soc, Vol.5, 820-823, 2008

1.7 Ziel dieser Arbeit

Rauchen ist nachweislich mit der Entwicklung einer Arteriosklerose verbunden. Einer der Hauptwirkstoffe in Tabak ist das Alkaloid Nikotin, welches für zahlreiche proarteriosklerotische Wirkungen verantwortlich gemacht wird. Die Arteriosklerose wird in der aktuellen Wissenschaft als chronisch-entzündliche Erkrankung der Blutgefäße angesehen. Neutrophile Granulozyten sind an dieser Entzündungsreaktion entscheidend beteiligt. Mit Hilfe ihres Enzyms Myeloperoxidase, sind sie in der Lage, eine endotheliale Dysfunktion herbeizuführen, welche den initialen Schritt der Arteriogenese darstellt.

In dieser Arbeit soll nun in mehreren Schritten untersucht werden, inwieweit Nikotin an der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion und dadurch an der Arteriogenese beteiligt ist. Dabei soll dem Enzym Myeloperoxidase, als zentrales Element unserer Arbeitshypothese, besondere Aufmerksamkeit zukommen.

Im ersten Teil soll die aktivierende Wirkung des Nikotins auf neutrophile Granulozyten untersucht werden. Hierfür soll versucht werden, eine Adhäsion, Infiltration und Degranulation der Granulozyten durch Nikotin herbeizuführen. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Hypothese der MPO-abhängigen Endotheldysfunktion. Auch hier soll Nikotin als Initiator dieses Pathomechanismus getestet werden, indem die Durchblutung der Mikrozirkulation sowie die Dilatationsfähigkeit der Aorta unter Nikotineinfluss untersucht wird.

Mit diesem Projekt wäre es möglich, einen maßgeblichen Mechanismus der Nikotin-induzierten und MPO-abhängigen Entwicklung der Arteriosklerose zu bestätigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Pharmaka

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck KGaA
AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Dextran Lösung 6% (Dextran from Leukconostoc mesenteroides)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline 1x (DPBS)	Life Technologies GmbH
EDTA (Ethyldiamintetraaceta)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol absolut	Merck KGaA
Fibronectin Human,Plasma	Life Technologies GmbH
Formaldehyd, methanolfrei	Tousimis Laboratory Supply
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1x	Life Technologies GmbH
Heparin-Natrium 25000 I.E.	ratiopharm GmbH
Histopaque-1077	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Hydrogen Peroxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck KGaA
Isofluran	Abott
Mayers Hämalaulösung	Merck KGaA
Milli-Q, Millipore	Merck KGaA
N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin (fMLP)	Sigma Aldrich Chemie GmbH
N,N-Dimethylformamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumazetat	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid Lösung (NaCl 0,9%)	B. Braun Melsungen AG

Nicotine 100mg, 1M, 162mg/ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Pancuronium bromide	Sigma Aldrich Chemie GmbH
PBS (phosphate buffered saline)	Life Technologies GmbH
Serumalbumin, bovines	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Tissue Tec® O.C.T. Compound	SAKURA Fintek Europe B.V.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile
AEC Substratlösung	800 mg AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol), 200 ml N,N,dimethylformamide
Arbeitslösung Ly-6-G Färbung	7.5 ml 20x AEC Lösung, 15 ml 10 x Natriumacetatpuffer pH 5.0, 150 ml Wasser, 150 µl Wasserstoffperoxid (30%)
Fixierungslösung	Formaldehyd 4%, PBS
Natriumacetatpuffer pH 5,0	28,75 ml Essigsäure, 41,015 g Natriumacetat, 1L demineralisiertes Wasser
Organbadpuffer (modifizierter Krebs- Puffer)	NaCl 28.9g/5l, KCl 1,75g/5l, CaCl ₂ 1,835g/5l, MgSO ₄ 1,48g/5l, NaHCO ₃ 10,5g/5l, KH ₂ PO ₄ 0,7g/5l, 7-D-Glukose 10g/5l, Indomethacin 17,875mg/15ml, H ₂ O HCl pH 7,35
Zellpuffer (Adhäsion)	Bovines Serumalbumin 0,25%, HBSS, steril filtriert

2.1.3 Antikörper

Primärer Antikörper	Spezifität	Hersteller
Ly-6G-anti mouse neutrophils	monoklonal	Hycult Biotech

Sekundärer Antikörper	Konjugat	Hersteller
IgG, rabbit anti-rat	Meerrettichperoxidase (HRP)	Dako Deutschland GmbH
IgG (H+L), anti-rabbit	Meerrettichperoxidase (HRP)	Vector Laboratories Inc.

2.1.4 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
MOUSE MPO HK210 ELISA KIT	Hycult Biotech

2.1.5 Mauslinien

Bezeichnung	Anbieter
B6.129X1- <i>Mpo</i> ^{tm1Lus} /J	The Jackson Laboratory
C57BL/6J	The Jackson Laboratory

2.1.6 Geräte, Apparaturen, Computerprogramme

Bezeichnung	Hersteller
Alzet Micro-Osmotic Pump Model 1002	DURECT Corporation
Chart 4.0 Software	ADSystems
Mac-Lab Kraftumwandler und	ADInstruments

Kraftaufnehmer, Version 8e)	
O2C (Oxygen to see)-Gerät	LEA Medizintechnik GmbH
Olympus CK2 Mikroskop	Olympus Europa Holding GmbH
Penlon Sigma Delta Isoflurane Anesthetic Vaporizer	Penlon Medical Gas Solutions
Prosilica GC-Kamera	Allied Vision Technologies GmbH
Retiga 1300 CCD Kamera	QImaging
StreamPix 5.2.0 Software	NorPix, Inc.

2.2 Methoden

Die Versuche innerhalb dieser Arbeit gliederten sich in einen *in vitro*-Teil, bei dem humane Granulozyten verwendet wurden und in einen *in vivo/ex vivo*-Teil, der auf der Grundlage eines Tierversuchs aufbaute.

2.2.1 *in vitro*-Teil

2.2.1.1 Isolation neutrophiler Granulozyten aus Vollblut

Für die Arbeit mit humanen Granulozyten wurden die Zellen aus venösem Blut isoliert. Jegliche Handhabung wurde unter extremer Vorsicht durchgeführt, um eine vorzeitige Aktivierung der Granulozyten zu vermeiden. Um die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut zu isolieren, wurde gesunden Nichtrauchern etwa 15 ml Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion einer Vene in der Ellenbeuge mittels einer „Butterfly“-Nadel. Für die Aufnahme des gewonnenen Blutes diente eine Perfusor®-Spritze 50ml. Damit sollte eine möglichst geringe Irritation der Granulozyten während der Entnahme erreicht werden. Um das gewonnene Blut ungerinnbar zu machen, wurde die Spritze zuvor mit dem Calcium-Komplexbildner EDTA (Ethyldiamintetraacetat, 100 µl EDTA/10ml Blut) präpariert. Das so gewonnene Blut wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen gefüllt. Um die Erythrozyten von den restlichen Zellen zu trennen, wurde dem Blut eine Dextran-Lösung im Verhältnis 1:1 zugegeben. Das Polysacharid Dextran wurde von den Erythrozyten aufgenommen und die Erythrozyten sanken zu Boden, während die restlichen Zellen unbeeinflusst blieben. Die

Dextran-Lösung bestand aus 45 mg/ml des hochmolekularen Polysaccharides Dextran und NaCl-Lösung. Nach 30 Minuten waren nahezu alle Erythrozyten sedimentiert und das als Überstand verbliebene Plasma mit den Leukozyten konnte problemlos abpipettiert werden. Als nächstes wurde das Plasma (im Folgenden wird Plasma als Synonym für den flüssigen Bestandteil des Blutes mit den darin enthaltenen mononukleären Zellen verwendet) vorsichtig auf 15 ml Histopaque®-1077 geschichtet, ohne dabei die beiden Flüssigkeiten miteinander zu vermischen. Histopaque®-1077 ist eine wässrige Lösung eines Polysaccharids und Natriumdiatrizoat mit hohem Molekulargewicht und einer Dichte von 1,077. Es dient als Medium zur Trennung mononukleärer Zellen aus Vollblut. Durch Zentrifugation wandern Bestandteile größerer Dichte durch das Trennmedium und werden klar voneinander abgrenzbar. Die Granulozyten werden leicht hyperton und nehmen Wasser auf. Dadurch sinken sie schneller zu Boden und bilden ein Pellet am Grund des Röhrchens. Die anderen mononukleären Zellen verbleiben als deutlich sichtbares Band an der Grenzfläche zwischen Plasma und Trennmedium. Die Zentrifugation erfolgte für 30 Minuten mit 600 rcf (relativen Zentrifugalbeschleunigung RZB; international gebräuchlich: relative centrifugal force bzw. rcf) bei 22°C und einer leichten Bremse von 2. Bis auf das Pellet wurde die gesamte Flüssigkeit abpipettiert und verworfen. Die möglicherweise im Pellet verbliebenen Erythrozyten wurden durch die Zugabe von 1,5 ml hypotonem Wasser Milli-Q lysiert. Milli Q ist deionisiertes und aufgereinigtes Wasser. (Zu diesem Zweck wurde das Pellet und die hypotone Lösung mittels einer Transferpipette schnell, mehrfach hintereinander aufgenommen und abgegeben.) Nach der Lyse wurde das Falcon Röhrchen mit den darin enthaltenen Zellen vollständig mit NaCl Lösung 0,9 % aufgefüllt und erneut für 10 Minuten mit 350 rcf und voller Bremse zentrifugiert. Dabei entstand ein festes Pellet auf dem Boden des Röhrchens. Die Flüssigkeit wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Pufferlösung aus HBSS und BSA 0,25% resuspendiert und auf Eis gelagert. Zur weiteren Verwendung wurden Zellsuspensionen mit 2 Millionen Zellen pro ml Puffer hergestellt. Dazu wurden die Zellen unter dem Mikroskop gezählt.

2.2.1.2 Bestimmung der Adhäsion

Die Bestimmung der Adhäsion erfolgte unter Verwendung von Fibronectin-beschichteten Plastik-wells.

Fibronectin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix und erfüllt unter anderem die Funktion eines Adhäsionsmoleküls. Über Fibronectine können Zellen an Oberflächen binden. Wird ein neutrophiler Granulozyt aktiviert, kommt es nach einer Reihe von Ereignissen zur Verbindung mit einer Oberfläche. β -Integrine des Granulozyten interagierten in diesem Fall mit dem Fibronectin. Um die adhärenen Zellen später unter dem Mikroskop zählen zu können, wurde eine transparente Mikrotiterplatte mit 24 Kammern verwendet. Der Mittelpunkt jeder Kammer wurde mittels einer Nadel markiert um später einen einheitlichen Ausgangspunkt für die Zählung zu erhalten. Jede Kammer wurde mit 500 μ l Fibronectin 50 μ g/ml PBS (Phosphat Buffered Saline) befüllt und für mindestens 1h bei Raumtemperatur beschichtet/inkubiert. Anschließend wurden die Kammern mit PBS ausgewaschen, um ungebundenes Fibronectin zu entfernen. Wie bereits erwähnt, binden Granulozyten erst dann zu einer Oberfläche, wenn sie vorher aktiviert wurden. In diesem Versuch sollte ermittelt werden, ob und in welchem Ausmaß sich die Zellen durch Nikotin aktivieren (adhärieren) lassen. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen einer Nikotininlösung hergestellt. Ein 1M Nikotin Stock wurde mit einem Puffer aus HBSS und BSA 0,25 % zu 1mM, 100 μ M und 10 μ M verdünnt. Als Positivkontrolle wurde N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) 1 μ M, verwendet. Dabei handelt es sich um ein von Bakterien gebildetes Formylpeptid, welches als primärer chemotaktischer Ligand auf neutrophile Granulozyten wirkt und diese aktiviert. Als Negativkontrolle diente der Zellpuffer (HBSS und BSA 0,25%). Jede Bedingung wurde anhand einer separaten Zellsuspension von 500 μ l getestet. Dazu wurde die Testlösung 1:10 mit der Zellsuspension gemischt und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Kammern geleert, durch Ausklopfen von Flüssigkeitsrückständen befreit und mit PBS gespült. Als nächstes erfolgte die Fixierung der adhärenen Zellen mit methanolfreiem Formaldehyd 4% in PBS für 10 Minuten. Nach einem weiteren Mal Waschen wurden alle Kammern mit 400 μ l PBS gefüllt und unter dem Mikroskop betrachtet. Um die Zellen zu zählen, wurden mit einer Kamera in 4 Quadranten rund um den markierten Mittelpunkt der Kammer bei zehnfacher Vergrößerung fotografiert. Anschließend wurden die Zellen auf den ausgedruckten Bildern ausgezählt.

2.2.1.3 Blockierung des Nikotin-Effekts durch Pancuronium

Zur Blockade der Nikotin-Wirkung wurde ein spezifischer Hemmstoff des nikotinischen Acetylcholinrezeptors verwendet. Pancuronium ist ein Steroid welches in der Medizin Verwendung als ein nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans findet und ein kompetitiver Antagonist am ACh-Rezeptor ist. Der Versuchsablauf war mit dem oben beschriebenen identisch. Allerdings wurden alle Zellen mit dem Rezeptorblocker vorbehandelt, ehe die unterschiedlichen Nikotin- und Kontroll-Lösungen dazugegeben wurden. Aus einer *stock*-Lösung (10mM) wurde stufenweise eine Verdünnung hergestellt, um die Zielkonzentration von 2000nM zu erhalten. Im letzten Schritt der Verdünnungsreihe wurde die Lösung direkt mit der Zellsuspension verdünnt. Nach 5 minütiger Inkubation wurden die Testlösungen (Nikotin, fMLP, Kontrolle) dazugegeben. Es erfolgte die Inkubation, Fixierung und Auswertung analog zum Adhäsionsversuch mit Nikotin.

2.2.2 *in vivo/ex vivo*-Versuchsreihe: Nikotineffekt in der Maus

Alle Untersuchungen im Rahmen dieses Tierversuchs wurden von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz –Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen- der Stadt Hamburg gemäß §7 TschG genehmigt. Die Versuchstiere stammten aus der Zucht der Versuchstierhaltung des UKE und waren tiergerecht und standardisiert untergebracht.

Alle Versuche dieses Projektteils basierten auf der akuten oder chronischen Behandlung lebender Mäuse mit Nikotin. Für die Untersuchung spezieller Fragestellungen war die Tötung der Tiere und die Organentnahme erforderlich.

Als Versuchstiere wurden zwei verschiedene Mauslinien verwendet, die jedoch einen gemeinsamen genetischen Hintergrund besaßen. Die KO (Knock Out)-Mauslinie B6.129X1-*Mpo^{tm1Lus}*/J und die Inzuchtmauslinie C57BL/6J. Letztere wird im weiteren Verlauf als „Wildtyp“-Linie bezeichnet. Bei den verwendeten Tieren handelte es sich überwiegend um Weibchen. Das Alter betrug durchschnittlich 10 Wochen und das Gewicht lag bei etwa 20 g.

2.2.2.1 Die Wildtyp-Maus (WT-Maus)

Als „Wildtyp“ bezeichnet man in der Wissenschaft allgemein ein Lebewesen, dessen Genom durch künstliche Eingriffe unverändert vorliegt und durch einen natürlichen Prozess (der Evolution) entstanden ist. In diesem Fall wurde die Inzuchtlinie C57BL/6J verwendet, die auch unter diesem Namen bei „The Jackson Laboratory“ kommerziell erhältlich ist. Diese Mauslinie bildet die Grundlage für eine Vielzahl an Mutationslinien und erfreut sich an einem breiten Einsatzgebiet in der Wissenschaft. Die Mauslinie C57BL/6J wurde von Dr. CC Little erschaffen.

2.2.2.2 Die MPO-Knockout-Maus (MPO-KO-Maus)

Die MPO-KO-Maus wurde ursprünglich von Aldons Lusis an der Universität von Kalifornien in Los Angeles, USA, erzeugt und ist bei „The Jackson Laboratory“ unter der Bezeichnung B6.129X1-*Mpo*^{tm1Lus}/J kommerziell erhältlich. Die verwendeten Tiere stammten aus eigener (Nach)Zucht. Von „*knock-out*“ (KO) spricht man, wenn durch ein gentechnisches Verfahren, meist das Einbringen einer Mutation, ein oder mehrere Gene deaktiviert werden. Die hier verwendete Mauslinie war homozygot für die Mutation des Gens, welches für das Myeloperoxidase-Enzym codiert, so dass kein Genprodukt, weder mRNA noch Protein, erzeugt wurde. Folglich wiesen die neutrophilen Granulozyten sowie die Monozyten keinerlei Myeloperoxidaseaktivität und Hypochloritproduktion auf. Hingegen entsprach die Leukozytenanzahl und Superoxidproduktion denen der Wildtyp-Maus. Die KO-Mäuse entwickelten sich normal und waren fortpflanzungsfähig. Als genetischer Hintergrund diente die C57BL/6J „Wildtyp“-Maus.

Myeloperoxidase bildet den Katalysator für die Oxidation von Chloridionen mit Wasserstoffperoxid. Dabei entsteht neben Wasser auch das Hypochloridion, welches wiederum selber verschiedene Biomoleküle oxidiert. Außerdem werden auch Nitrit und Stickstoffmonoxid durch die Peroxidase oxidiert. Laut unserer Hypothese kommt es nach der Aktivierung der PMNs z.B. durch Nikotin zur Freisetzung des MPO. Freies MPO wiederum führt zu einer verringerten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid in der Gefäßwand und dadurch zu einer Endotheldysfunktion. Anhand der KO-Maus sollte dieser Mechanismus (Zusammenhang) untersucht und eventuell bestätigt werden.

2.2.2.3 Nikotindosierung

Um den Effekt von Nikotin bestimmen zu können, wurden Wildtyp- und KO-Mäuse mit Nikotin nach einem akuten und/oder chronischen Schema vorbehandelt. Zu diesem Zweck wurde flüssiges Nikotin 162,2 g/mol (Sigma) in Ethanol gelöst. Das gelöste Nikotin wurde für die gewünschte Zielkonzentration in Natriumchlorid-Lösung 0,9% verdünnt. Als Negativkontrolle diente das Lösungsmittel in entsprechender Verdünnung. Die Behandlung unterschied sich in Art, Dauer und Menge der Applikation. Im Tierversuch spielten eine Reihe von Faktoren eine wichtige Rolle bei der Wahl der geeigneten Konzentration. Wir orientierten uns an Richtwerten, wie sie in der Literatur als allgemeiner Konsens zu finden waren. Für die Akutbehandlung verwendeten wir eine Nikotinkonzentration von 3mg/kg. Diese relativ hohe Konzentration begründete sich durch die Tatsache, dass Tiere im Allgemeinen Nikotin wesentlich schneller metabolisieren als Menschen (Gorrod and Jenner 1975; Scheline 1978;)(Seaton und Vesell 1993). So hat Nikotin in der Maus nur eine relativ kurze Plasma-Halbwertszeit von 6-7 Minuten. Außerdem spielte die Art der Applikation eine entscheidende Rolle. Durch den sehr hohen „*first pass-Effekt*“ wurden annähernd 70% des intraperitoneal injizierten Nikotins umgehend metabolisiert. Diese Gründe erforderten eine höhere Nikotindosierung im Tierversuch im Vergleich zur, in das menschliche Kreislaufsystem, aufgenommenen Nikotinmenge nach dem Rauchen einer Zigarette.

Neben der Gattung und den Enzymsystemen beeinflussten auch Faktoren wie das Alter oder das Geschlecht den Metabolismus. So läuft der Stoffwechsel bei weiblichen Individuen schneller ab als bei männlichen (N. L. Benowitz u. a. 2006) und im Alter ist der Metabolismus gegenüber jungen Individuen verlangsamt (Molander, Hansson, und Lunell 2001). Auch Stress hat möglicherweise einen beschleunigenden Einfluss auf die Verstoffwechslung, dies gilt insbesondere für den Tierversuch.

2.2.2.4 Chronisches Modell: Osmotische Minipumpen

Um eine kontinuierliche und über einen längeren Zeitraum reichende Belastung mit Nikotin zu erreichen, wurden den Tieren kleine osmotische Pumpen implantiert. Die Implantation war ein einmaliges Ereignis und im Gegensatz zu einer wiederholten Injektion relativ schonend für das Tier. Die Implantation der Minipumpen (Model 1002, ALZET® Osmotic Pump, DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA) erfolgte unter

Inhalationsnarkose mit Isofluran. Die Mäuse wurden in Rückenlage auf einer 40°C warmen Heizplatte positioniert und erhielten eine Analgesie mit Metamizol 200mg/kg subcutan. Über einen interscapulären Hautschnitt wurde eine 2 cm lange subcutane Tasche stumpf präpariert, in welche die Pumpe eingelegt wurde. Anschließend wurde der Schnitt durch Klammern verschlossen und die Narkose beendet. Die Pumpe lag 7 Tage und förderte 25ng/g*min Nikotin gelöst in NaCl.

2.2.2.5 Akutmodell: Intraperitoneale Injektion

Um den akuten Effekt von Nikotin zu untersuchen erfolgte die Verabreichung via intraperitonealer Injektionen unter Inhalationsnarkose mit Isofluran. Die Mäuse wurden in Rückenlage auf einer 40 °C warmen Heizplatte positioniert. Durch eine Hautfalte auf Höhe der Lendenwirbelsäule wurde der Bauchraum mit einer Kanüle perforiert. Es erfolgte die intraperitoneale Applikation von 100µl Nikotininlösung. Der Vorgang wurde dreimal im Abstand von 10 Minuten wiederholt. An die letzte Injektion schloss sich eine narkosefreie Ruhephase von einer Stunde an, ehe die Mäuse zur weiteren Versuchsdurchführung erneut in Narkose versetzt wurde. Die verwendete Nikotinkonzentration betrug 3mg/kg Körpergewicht. Als Kontrolle wurde Ethanol gelöst in NaCl in gleichem Volumen gespritzt.

2.2.2.6 Blut- und Organentnahme

Weiterführende Untersuchungen erforderten die Entnahme von Blut und der inneren Organe. Die Maus befand sich in maximal dosierter Isofluran-Narkose. Der Thorax der Maus wurde in Rückenlage, vom Zwerchfell aus eröffnet und die Vena cava inferior freipräpariert. Nach einer Läsion der Vene wurde das austretende Blut mittels einer, mit Heparin präparierten, 1ml-Spritze aufgenommen, in ein 1 ml *Eppendorf*-Röhrchen überführt und für weitere Zwecke bei -80°C gelagert. Die Blutentnahme stellte das letale Ereignis dar. Herz, Lunge und Skelettmuskel wurden entnommen, mit NaCl Lösung gespült und für die histologische Untersuchung in Einbettmedium bei -80°C gelagert. Für das Organbad wurde die Aorta vorsichtig freipräpariert und an ihren Enden abgesetzt.

2.2.2.7 Organbad

Zur Durchführung des Organbads wurde die Maus zunächst, wie unter 2.2.2.5 beschrieben, vorbehandelt. Anschließend wurde die Aorta der Maus freipräpariert und entnommen. Aus der Aorta wurden mit einem Skalpell zwei gleich große Ringe (ca. 0,5 cm Länge) geschnitten, auf jeweils zwei Haken aus rostfreiem Stahl aufgezogen und in einer Glaskammer unter leichter Spannung (0,2 g) aufgehängt. Dabei diente der untere Haken zur Befestigung und der obere Haken zur Übertragung der isometrischen Spannung. Das komplette System wurde mit einer Organbadpufferlösung befüllt. Der Puffer in der Kammer wurde kontinuierlich mit Frischgas (95% O₂, 5% CO₂) belüftet und durch ein Überlaufsystem bei einem Volumen von 25ml in der Kammer konstant gehalten. Über zusätzliche Reservoirs konnte dem System frischer Puffer zugeführt und verunreinigter Puffer ausgewaschen werden. Die Pufferlösung in den Kammern wurde durch ein umgebendes Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C erhitzt. Um Spannungsänderungen zu messen und einzustellen wurde der obere Haken über einen Draht und eine Stellschraube mit einem Kraftaufnehmer und einem Kraftumwandler (Mac-Lab/8e) verbunden, der sein Signal digitalisiert an einen Computer weiterleitete. Zur Auswertung am Computer wurde das Programm Chart 4.0 (ADSystems, Chalgrove, UK) verwendet.

Die initiale Spannung wurde durch Drehen an der Stellschraube über ca. 30 min schrittweise auf einen Ausgangswert von 1,1 g gesteigert. Die dadurch erreichte Spannung wurde als „Ruhetonus“ definiert und entsprach 100% Relaxation. Vor der eigentlichen Relaxation wurden alle Ringe mit Prostaglandin F₂ (PGF₂, 10-17µl, 10⁻²M) so vorkontrahiert, dass die Spannung ca. um 0,5 – 1g von 1,1g anstieg. Der dadurch erreichte Spannungswert wurde als 100% Kontraktion (0% Relaxation) definiert und diente als Ausgangswert für den weiteren Versuchsablauf. Die Bestimmung der endothelvermittelten Relaxation erfolgte durch die Zugabe von Acetylcholin (ACh) in logarithmischen Schritten von 0,5 (10⁻⁹ – 10^{-5,5}M). Die endothelunabhängige Relaxation erfolgte nach gleichem Schema mit Nitroglycerin (NTG, 10⁻⁹ – 10^{-4,5}M). Zwischen allen Schritten wurden die Kammern gründlich mit frischer Pufferlösung gespült. Die Zugabe der einzelnen Reagenzien erfolgte mit einer geeichten Pipette in die nach oben offenen Kammern. Die erzielte Relaxation durch die jeweilige Konzentration des Reagenz wurde als Prozentwert in Bezug auf die Maximalkontraktion unter PGF₂ angegeben.

2.2.2.8 Perfusionmessung/O2C-Sonde

Um die Durchblutungsparameter in der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur bestimmen zu können wurde das O2C-Gerät der Firma LEA Medizintechnik, Gießen, verwendet. Die Mäuse wurden nach dem chronischen Modell mit Nikotin vorbehandelt (siehe 2.2.2.4). Die Messung erfolgte unter Inhalationsnarkose mit Isofluran. Die Mäuse wurden in Rückenlage auf einer 37 °C warmen Heizplatte positioniert. Über einen Hautschnitt an der Innenseite des Oberschenkels wurde die Oberschenkelmuskulatur teilweise freigelegt und eine Sonde (O2C, LEA Medizintechnik, Gießen) parallel zur Muskeloberfläche platziert. Während der Messung wurde die freie Muskeloberfläche kontinuierlich mit 37°C warmer NaCl-Lösung benetzt.

Bei diesem Verfahren kam die Weißlicht-Spektroskopie sowie das Laser-Doppler-Prinzip zum Einsatz. Über ein Glasfaserkabel und die oben erwähnte Sonde wurde gleichzeitig Weißlicht (Wellenlänge 500 – 800 nm) und Laserlicht (Wellenlänge NIR, nahes Infrarot) in das Muskelgewebe eingebracht und dort von Zellen und Zellbestandteilen absorbiert und reflektiert. Das reflektierte Licht wurde über Detektoren am Sondenkopf aufgenommen. Farbveränderungen des reflektierten Weißlichts gaben Rückschluss auf die Parameter Sauerstoffsättigung des Hämoglobins (SO₂) und Hämoglobinmenge(rHb). Durch Frequenzverschiebungen (sog. Doppler Shift) des Laserlichts ließen sich Fließgeschwindigkeit und Blutfluss in der Mikrozirkulation ermitteln. O2C wurde auf die Bewegung der roten Blutkörperchen optimiert, also auf die Bestimmung der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in Kapillaren, Arteriolen, Venolen und kleineren Gefäßen.

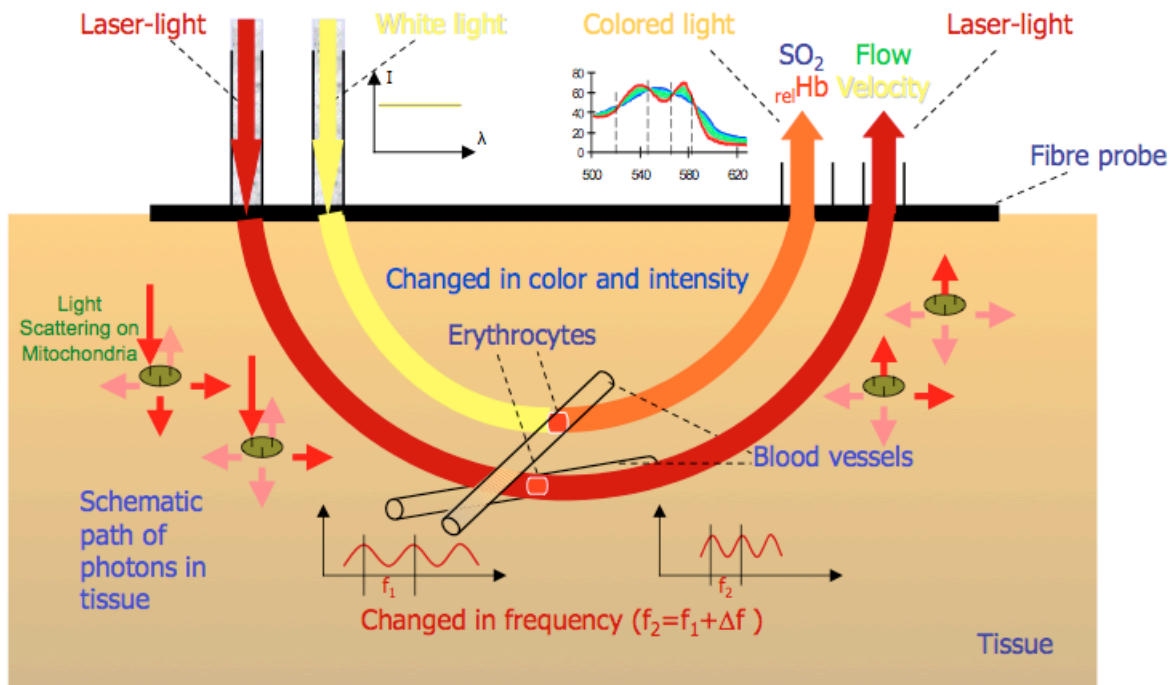


Abb. 12: Schematische Darstellung der O2C (oxygen to see) Funktion. Weißlicht und Laserlicht breitet sich bogenförmig im Gewebe aus, wird an Mitochondrien gestreut und gelangt zurück zur Sonde. Mit freundlicher Genehmigung der LEA Medizintechnik GmbH, Giessen, Germany

2.2.2.9 Bestimmung der MPO-Spiegel

Die MPO-Spiegel wurden mit Hilfe des Enzym linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt, einem auf der Antigen-Antikörper-Reaktion basierenden Nachweisverfahren. In diesem Fall wurde das Maus MPO ELISA Kit HK 210 (Hycult Biotech, Uden, Niederlande) verwendet.

2.2.2.9.1 Myeloperoxidase-Spiegel des Mäuesplasmas

Zur Gewinnung des Mäuseplasmas wurde der Thorax der Maus unter Narkose eröffnet und die Vena cava inferior kurz oberhalb ihres Eintritts in das Mediastinum perforiert. Das austretende Blut wurde mit einer 1ml Spritze aufgefangen, die zuvor mit Heparin in entsprechender Menge befüllt worden war. Das so ungerinnbar gemachte Blut wurde in einer Zentrifuge für 6 Minuten mit 3rcf (relativen Zentrifugalbeschleunigung RZB; international gebräuchlich: relative centrifugal force bzw. rcf) zentrifugiert und anschließend das Plasma vorsichtig mit einer Pipette entnommen. Dabei wurde darauf

geachtet, beim Pipettieren keine Zellen mit aufzunehmen, da dies den MPO Spiegel hätten verfälschen können.

2.2.2.9.2 Methode der Heparin-Perfusion

Bei dieser Methode sollte das MPO, welches nach seiner Freisetzung an das Endokard gebunden hatte, mit einer Heparinlösung ausgespült werden und der Gehalt an MPO in der Spüllösung bestimmt werden. Die verwendete Heparinlösung bestand aus Heparin 50 Units/ml und Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (engl. Phosphat Buffered Saline, PBS). Der Thorax der Maus wurde unter Narkose eröffnet und die Vena cava inferior kurz oberhalb ihres Eintritts in das Mediastinum durchtrennt. Dies stellte das letale Ereignis dar. Mit einer Kanüle wurde der linke Ventrikel punktiert und das Herz wurde mit PBS gespült. Anschließend wurde das Herz entnommen und über einer Petrischale auf eine stumpfe Kanüle so aufgezogen, dass die Kanüle in der Aorta ascendens zu liegen kam. Zur Befestigung wurde die Aorta ascendens mit einem Faden um die Kanüle ligiert. Das Herz wurde darüber nochmals mit 100 µl PBS vorgespült ehe es mit 2 ml der Heparinlösung gespült wurde. Die austretende Heparinlösung wurde mit einem Falcon Röhrchen aufgefangen. Mit einem Rotations-Vakuum-Konzentrator wurde das Volumen der gewonnenen Lösung auf eine für den ELISA gebräuchliche Menge verringert.

2.2.2.9.3 Durchführung des Maus MPO ELISA

Zur Vorbereitung wurde mit dem mitgelieferten MPO-Standard eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen erstellt. Diese ermöglichte später die genaue Bestimmung der MPO-Konzentration der Proben. Alle Plasmaproben wurden mit einem speziellen Puffer 4fach verdünnt. Standardlösungen und Plasmaproben wurden nun auf eine, mit einem MPO-Antikörper (sog. coating-Antikörper) vorbeschichtete, Mikrotiterplatte pipetiert und diese für eine Stunde inkubiert. Nach Ablauf der Stunde wurden alle ungebundenen Stoffe durch viermaliges Waschen mit einer speziellen Waschlösung entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten sekundären Antikörper, der ebenfalls an ein Epitop der MPO bindet. Biotin und Streptavidin gehen in der Natur eine der stärksten, nicht kovalenten Bindungen ein. Diese Erkenntnis machte man sich im nächsten Schritt zu Nutze. Nach wiederholtem viermaligen Waschen erfolgte die Inkubation mit dem enzymmarkierten Streptavidin

für eine weitere Stunde. Das an Streptavidin gebundene Enzym, die Meerrettichperoxidase, reagiert zunächst mit Wasserstoffperoxid und daraufhin mit dem Substrate und wandelt dieses anfangs farblose Chromogen in ein farbiges Endprodukt um. In diesem Fall erfolgte nach viermaligem Waschen die Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB), welches in ein blaues Endprodukt umgewandelt wird und durch Zugabe von Stopplösung in Form von Oxalsäure, eine Dicarbonsäure, in einen stabilen gelben Komplex überführt wird. Mittels Spektrophotometer wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und anhand einer Kalibrationskurve (gebildet aus den Werten der Standard-Verdünnungsreihe mittels linearer Regression) die jeweiligen MPO-Konzentrationen berechnet.

2.2.2.10 Immunhistochemische Färbung von Organschnitten

Um die Rekrutierung/Infiltration neutrophiler Granulozyten innerhalb der Organe (Herz- und Skelettmuskel sowie Lunge) zu bestimmen, wurden die Organe geschnitten und Leukozyten-spezifisch angefärbt.

2.2.2.10.1 Schneiden der Organe

Die Organe wurden direkt nach der Entnahme mit NaCl-Lösung gespült und anschließend in Einbettmedium gelegt. Für den weiteren Gebrauch wurde das Medium mit Flüssigstickstoff gehärtet und bei -80°C gelagert. Mit einem Gefriermikrotom wurden 3 µm dicke Schnitte erstellt und auf einen Glasobjektträger platziert. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und bei -80°C gelagert. Von jedem Organ wurden mindestens 6 Schnitte aus unterschiedlichen Bereichen angefertigt.

2.2.2.10.2 Ly-6G Färbung

Bei der Ly-6G Färbung handelt es sich um ein immunhistochemisches Verfahren nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip. Dabei wird eine Oberflächenstruktur, ein sog. Epitop von einem spezifischen Antikörper, oder auch primären Antikörper, als Antigen erkannt und gebunden. Über mehrere Schritte mit weiteren Antikörpern wird dieses Epitop schließlich durch ein Substrat sichtbar angefärbt. Deswegen bezeichnet man dieses

Vorgehen auch als indirekte Methode. In diesem Fall sollte das Lymphozytenantigen-6G (Ly-6G) sichtbar gemacht werden. Ly-6G ist ein Synonym für das Granulozyten-Differenzierungsantigen Gr-1, ein Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-verankertes Zelloberflächenantigen, welches von Makrophagen und Monozyten exprimiert wird. Um die Organschnitte für die Färbung vorzubereiten, wurden sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 100% Aceton fixiert und für weitere 5 Minuten an der Luft getrocknet, ehe sie für weitere 2 Minuten mit PBS rehydriert wurden. Zur einfacheren Handhabung wurden alle Objektträger in einer speziellen Halterung platziert. Die so vorbereiteten Schnitte wurden dann mit dem primären Antikörper für eine Stunde inkubiert. Als Antikörper wurde der Anti- Maus Ly-6G Antikörper(Immunglobulin) verwendet. Nach der Inkubation wurden alle Schnitte mit 100 µl PBS gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der nächste Schritt diente der Reduzierung einer unspezifischen Hintergrundfärbung bei der Verwendung von AEC (3-amino-9-ethyl-carbazol) Substratlösung. Hierbei kann es auf Grund der gewebeeigenen Peroxidase zu einer solchen unspezifischen Hintergrundfärbung kommen. Deswegen erfolgte im nächsten Schritt die irreversible Inaktivierung der Peroxidase durch Inkubation aller Schnitte mit Wasserstoffperoxid (125 µl 30% H₂O₂ in 50 ml PBS) für 15 Minuten. An diesen Schritt schloss sich ein erneuter Waschschriff mit 100 µl PBS an. Danach erfolgte die 30 minütige Inkubation mit dem Enzym-markierten Zweitantikörper. Dieser „Hasen-Anti-Ratte-Antikörper wurde mit dem Enzym Meerrettichperoxidase versehen, welches das chromogene Substrat AEC in ein rotes Endprodukt überführt. Auch danach erfolgte ein Waschschriff. Im vorletzten Schriff erfolgte die 30 minütige Inkubation mit dem Drittantikörper Ziegen-Anti-Hasen-Antikörper, der ebenfalls mit Peroxidase bestückt ist und der Signalverstärkung dient. Nach gründlichem Waschen erfolgte im letzten Schriff die Zugabe der Substratlösung. Der dadurch erzeugte Farbumschlag wurde unter dem Mikroskop verfolgt und nach dem Erreichen der gewünschten Intensität (ca 5—10 Minuten) unterbrochen. Zu diesem Zweck wurde die Substratlösung verworfen und die Objektträger wurden mit Leitungswasser gespült. Danach wurden die Schnitte in einen mit Hämatoxylin gefüllten Glasbehälter für circa 10 Sekunden eingetaucht und dann unter fließendem Leitungswasser gründlich abgespült. Zuletzt wurde der so gefärbte Organschnitt mittels eines Glasblättchens und faramount-Medium verschlossen.

2.2.3 Statistik

Alle Daten innerhalb dieser Arbeit wurden anhand der berechneten Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler angegeben und mittels t-Test beziehungsweise der ANOVA-Analyse mit anschließendem Fischers LSD Post-hoc-Test auf ihre Signifikanz geprüft. Ein p-Wert kleiner als 0,05 galt als statistisch signifikant. Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Computersoftware IBM SPSS Statistics durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Nikotin steigert die Adhäsion neutrophiler Granulozyten

3.1.1 Die Beeinflussung der Adhäsion neutrophiler Granulozyten durch Nikotin

Um zu untersuchen, ob Nikotin die Adhäsion zu einer mit Fibronektin beschichteten Plastikoberfläche einer 24-well-Platte induzieren und steigern kann, wurden neutrophile Granulozyten aus humanem Spenderblut isoliert und in die wells pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Nikotin-Konzentrationen inkubiert, ehe die adhärenen Zellen unter dem Mikroskop mit zehnfacher Vergrößerung ausgezählt wurden.

Die Betrachtung der absoluten Mittelwerte lässt einen Trend der konzentrationsabhängigen Zunahme der nikotininduzierten Adhäsion erkennen. Diese ist jedoch, absolut gesehen, nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (für Nic 1 μM 378 \pm 81, $p=0,99$; Nic 100 μM 588 \pm 89, $p=0,25$; Nic 1mM 720 \pm 113, $p=0,07$).

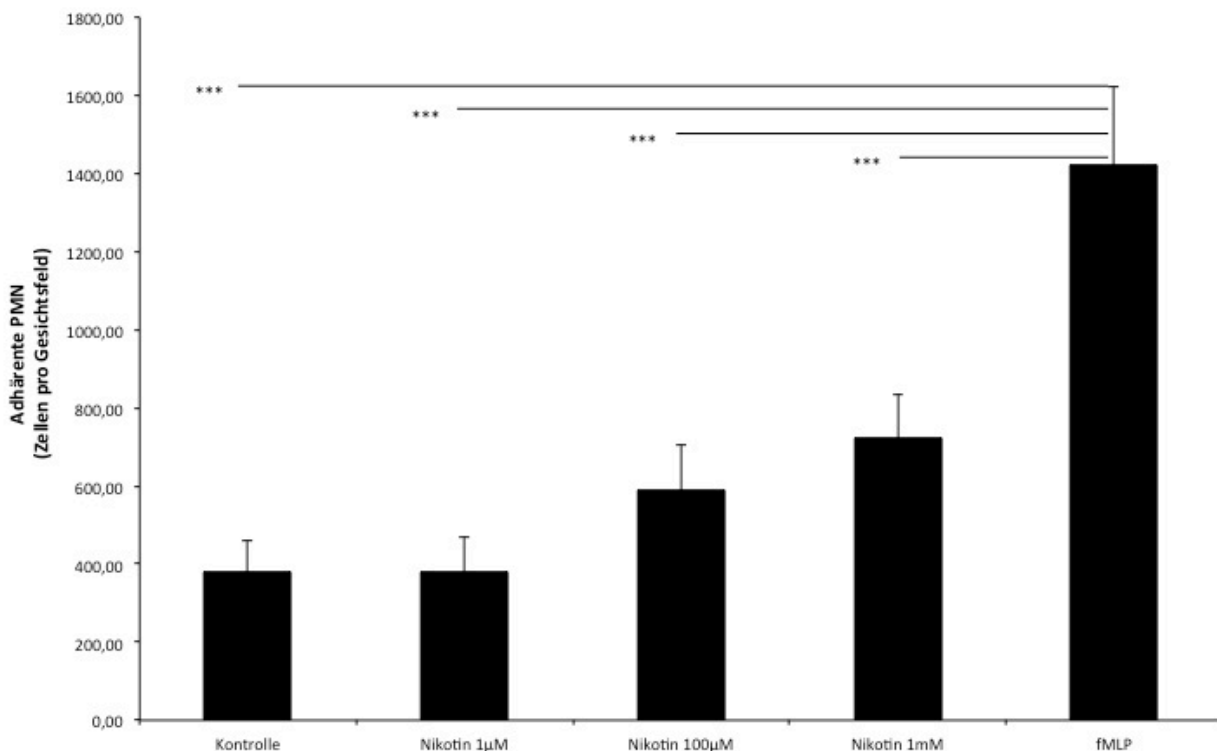


Abb. 13: **Adhäsion neutrophiler Granulozyten (PMN) an Fibronektin (FN) unter Nikotin.** Dargestellt sind die absoluten Zahlen adhärenen Zellen (Kontrolle = adhärenen Zellen ohne Nikotinzugabe). fMLP = N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin; Mittelwerte \pm SEM; $n=10-12$; $p < 0,001 \cong ***$

Betrachtet man jedoch jeweils den relativen Anstieg der Nikotin-induzierten Adhäsion eines einzelnen Experiments, ergibt sich im Mittel ein signifikanter Anstieg. Dazu wurden die Ergebnisse individuell auf die jeweilige Kontrolle (Kontrolle = 100% Adhäsion) genormt und dann der jeweilige Mittelwert berechnet (für Nic 1 μ M 103% \pm 10, $p=0,94$; Nic 100 μ M 179% \pm 18, $p=0,08$; Nic 1mM 235% \pm 34, $p=0,006$). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 10 zusammengefasst.

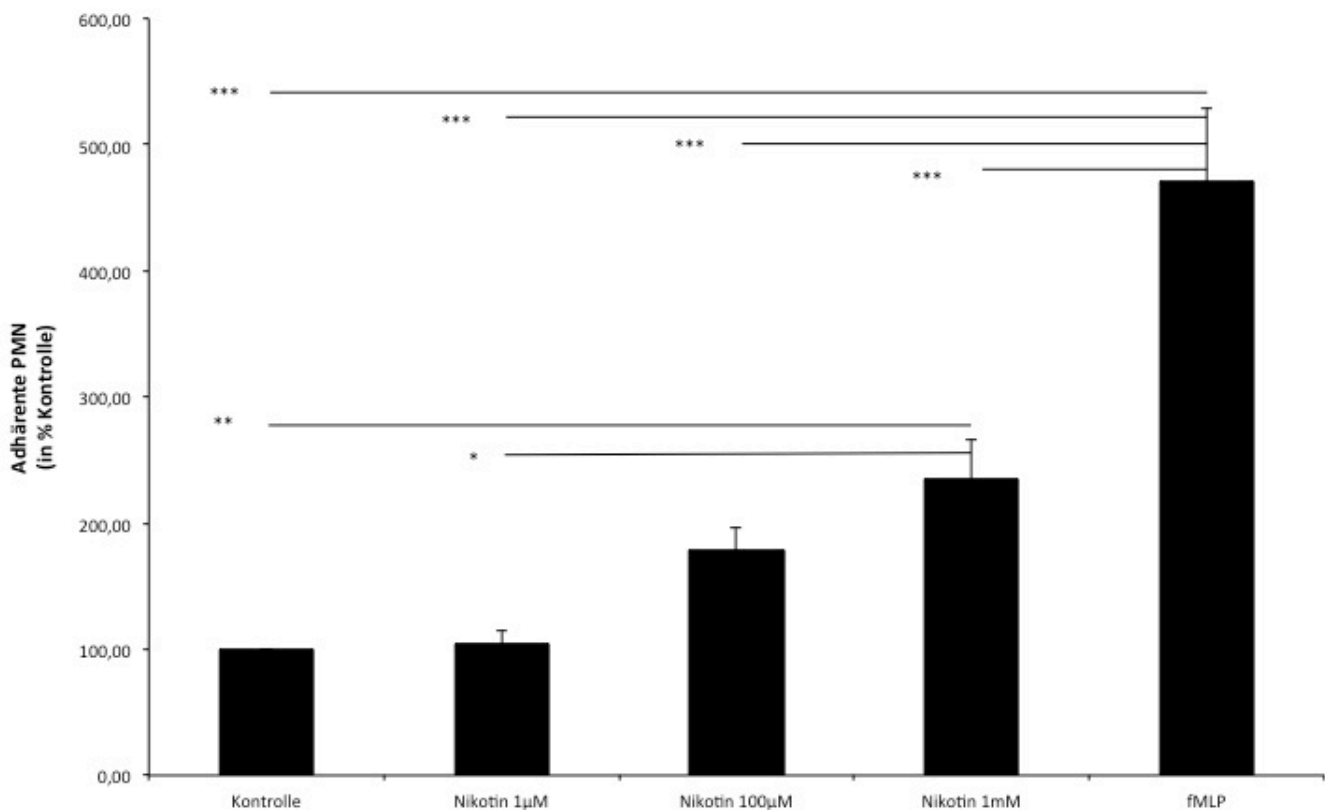


Abb. 14: **Adhäsion neutrophiler Granulozyten (PMN) an Fibronectin (Fn) unter Nikotin.** Dargestellt sind die Zahlen adhärenter Zellen als Prozent des Kontrollwerts (Kontrolle = 100%; Adhärenz Zellen ohne Nikotinzugabe). fMLP=N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin; Mittelwerte \pm SEM; $n=10-12$; $p < 0,05 \cong *$, $p < 0,01 \cong **$, $p < 0,001 \cong ***$

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Nikotin die Adhäsion neutrophiler Granulozyten konzentrationsabhängig steigert.

3.1.2 Unterdrückung der Nikotinwirkung durch Blockade des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors

In der Fortführung des Adhäsionsversuchs wurde untersucht, ob der Effekt von Nikotin auf die Adhäsion der PMNs durch den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor vermittelt wird. Dazu wurden die Zellen zuerst mit dem AChR-Blocker Pancuronium (100 μ M) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Nikotin und die Ermittlung adhärenter Zellen unter dem Mikroskop. Es wurde erwartet, dass Pancuronium den Nikotineffekt blockieren, beziehungsweise vermindern kann. Eine Identifizierung der Rezeptoruntergruppe fand nicht statt.

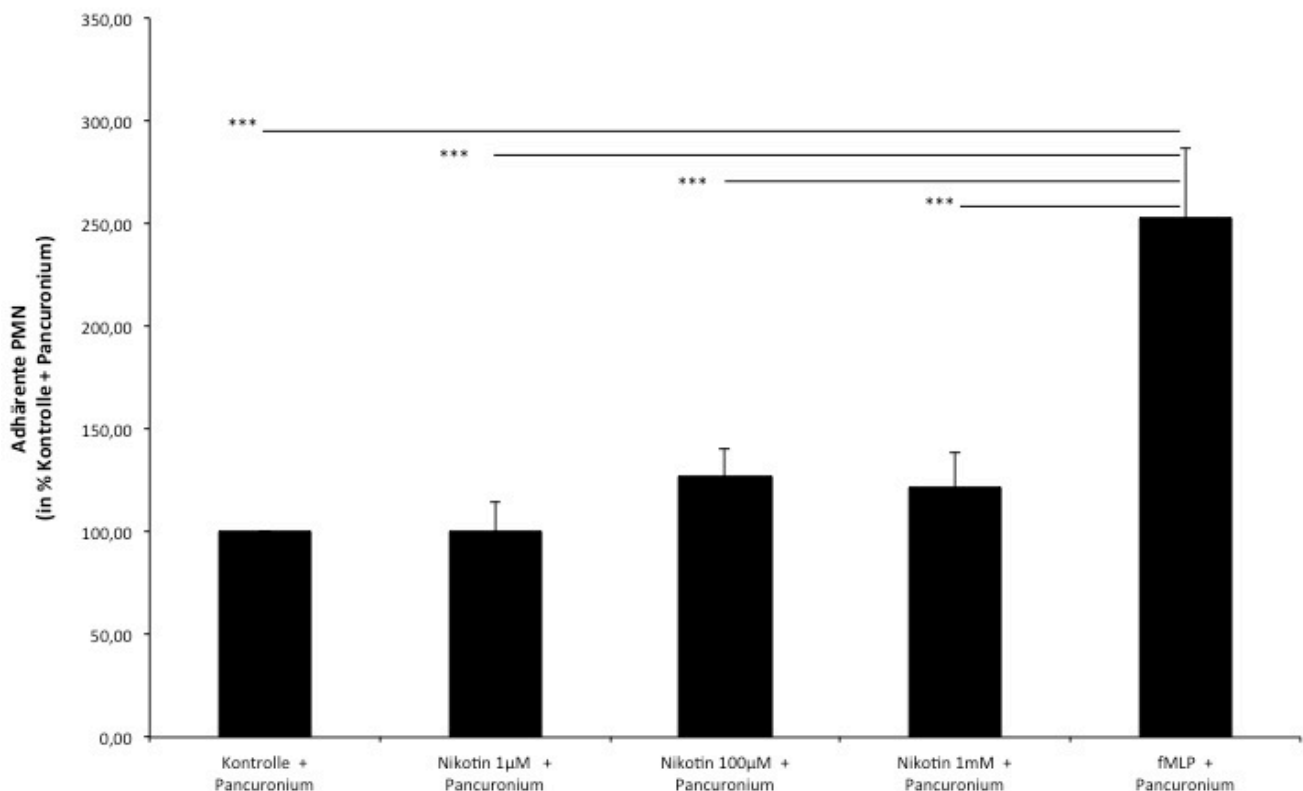


Abb. 15: **Adhäsion neutrophiler Granulozyten (PMN) zu Fibronectin (Fn) nach Inkubation mit Pancuronium.** Dargestellt sind die Zahlen adhärenter Zellen als Prozent des Kontrollwerts (Kontrolle + Pancuronium = 100%; Kontrolle + Pancuronium = adhärente Zellen ohne Zugabe von Nikotin). fMLP=N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin; Mittelwerte +/- SEM; n=4; p < 0,05 \cong *, p < 0,01 \cong **, p < 0,001 \cong ***

Die Daten wurden wie zuletzt beschrieben in einen relativen Zusammenhang mit der Kontrollgruppe gesetzt. In diesem Fall wird durch Nikotin keine signifikante Steigerung der Adhäsion gegenüber der Kontrolle erreicht (Nic 1 μ M 100% \pm 14, p=0,99; Nic 100 μ M 127% \pm 14, p=0,34; Nic 1mM 122% \pm 16,p=0,44). Ebenfalls ist kein Trend zur Konzentrationsabhängigkeit der Nikotinwirkung zu erkennen.

Daraus lässt sich folgern, dass der Effekt von Nikotin auf die Adhäsion der Granulozyten durch den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor vermittelt wird, da der Mechanismus durch die Blockade des Rezeptors effektiv gehemmt werden kann.

3.2 Nikotin verursacht eine Degranulation der PMN und MPO Freisetzung

Wenn Nikotin in der Lage ist, neutrophile Granulozyten zu aktivieren, so dass diese ihre Enzymsysteme freisetzen, müsste sich dies durch einen erhöhten MPO Spiegel nachweisen lassen. Vor dem Hintergrund, dass MPO nach der Freisetzung an Heparansulfat-Glucosaminoglycane (GAG) auf der Oberfläche der Endothelzellen bindet (Daphna u. a. 1998) (Buffon u. a. 2002; Lau und Baldus 2006), wurde das explantierte Herz der nikotinbehandelten Maus mit einer Heparinlösung gespült, um die wandständige MPO zu lösen. Die aufgefangene Spülflüssigkeit wurde mittels ELISA auf ihren MPO-Gehalt untersucht.

Die Abbildung zeigt einen signifikant erhöhten MPO-Gehalt (104,51 ng/ml \pm 10,13; p = 0,03) der Spüllösung aus dem Herz der nikotinbehandelten Maus gegenüber der unbehandelten Maus (61,87 ng/ml \pm 7,59).

Damit wurde bestätigt, dass Nikotin die MPO Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten induziert und das freigesetzte MPO endothelial akkumuliert. Die Freisetzung von MPO kann als indirekter Nachweis der Zellaktivierung durch Nikotin interpretiert werden.

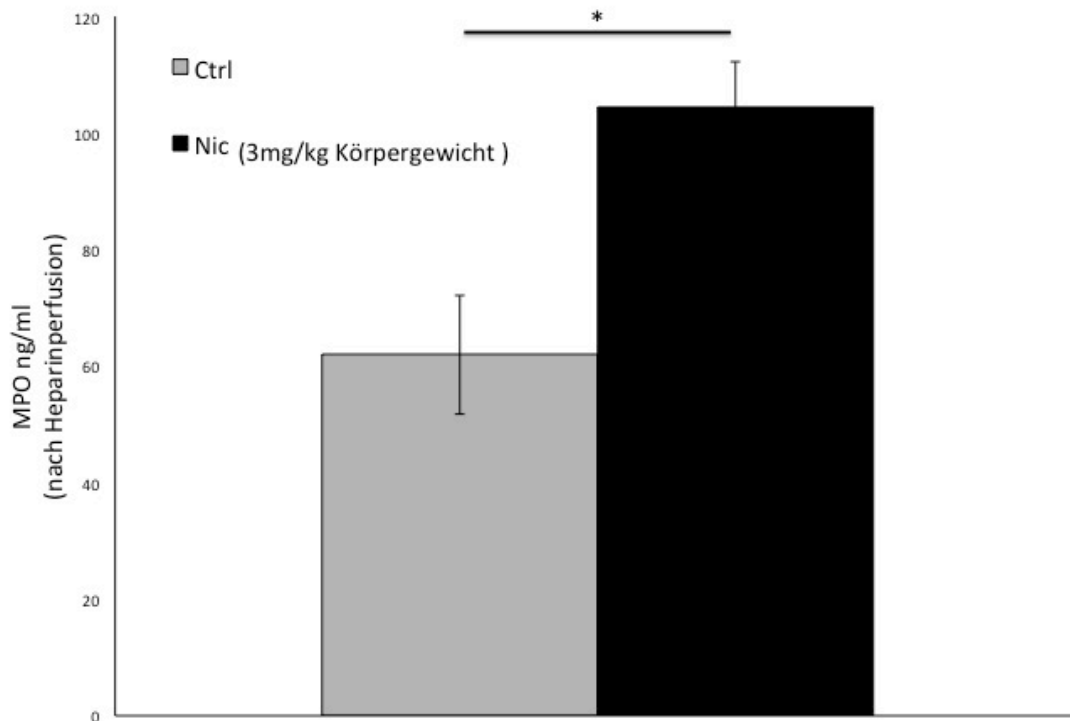


Abb. 16: **MPO Spiegel der Spüllösung nikotinbehandelter (Nic; n=3) und Vehikel-behandelter (Ctrl; n=3) Tiere.** Mittelwerte +/- SEM; Nach Behandlung der Mäuse mit Nikotin- bzw. Kontroll-Lösung, erfolgte die Spülung des explantierten Herzens mit Heparinlösung. Die Bestimmung des MPO-Gehalts erfolgte mittels ELISA.

$p < 0,05 \cong *$, $p < 0,01 \cong **$, $p < 0,001 \cong ***$

3.3 Nikotin bewirkt eine Infiltration/Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

3.3.1 Nikotin beeinflusst die Infiltration/Rekrutierung

Die Untersuchung der möglichen Beeinflussung von Infiltration, beziehungsweise Rekrutierung neutrophiler Granulozyten durch Nikotin erfolgte im Tierversuch. Dazu erhielten Wildtyp- und MPO-KO-Mäuse intraperitoneale Nikotin-Injektionen. Anschließend wurden die Lungen entnommen und davon Kryoschnitte angefertigt. Die Granulozyten im Lungengewebe wurden immunhistochemisch gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

Bei der Betrachtung der histologischen Präparate der Wildtyp-Population lässt sich eine deutlich gesteigerte Anzahl von PMNs im Lungengewebe der nikotinbehandelten Tiere gegenüber den unbehandelten Tieren feststellen. Innerhalb der Nikotin-Gruppe (WT Nikotin) finden sich durchschnittlich 131 ± 14 Zellen/Gesichtsfeld und damit signifikant mehr ($p < 0,001$), als innerhalb der Kontroll-Gruppe (WT Kontrolle: 31 ± 11 Zellen/Gesichtsfeld).

Neben Wildtyp Tieren kamen auch MPO KO Mäuse zum Einsatz. Mit Ihrer Hilfe sollte untersucht werden, ob die beobachtete Beeinflussung der Infiltration beziehungsweise Rekrutierung durch Nikotin MPO-abhängig geschieht. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich von Kontrollgruppe und Nikotingruppe (KO Kontrolle 26 ± 5 Zellen/Gesichtsfeld; KO Nikotin 32 ± 12 Zellen/Gesichtsfeld; $p = 0,72$). Unter Nikotineinfluss (MPO KO Nikotin) kann auch keine erhöhte Anzahl von Granulozyten im Lungengewebe gegenüber der Kontrolle der Wildtyp Population (WT Kontrolle) festgestellt werden ($p = 0,75$ für KO Kontrolle vs WT Kontrolle, $p = 0,94$ für KO Nikotin vs WT Kontrolle).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Nikotin die Infiltration/Rekrutierung neutrophiler Granulozyten akut induziert. Dabei scheint der Vorgang im Zusammenhang mit Nikotin abhängig von MPO zu sein.

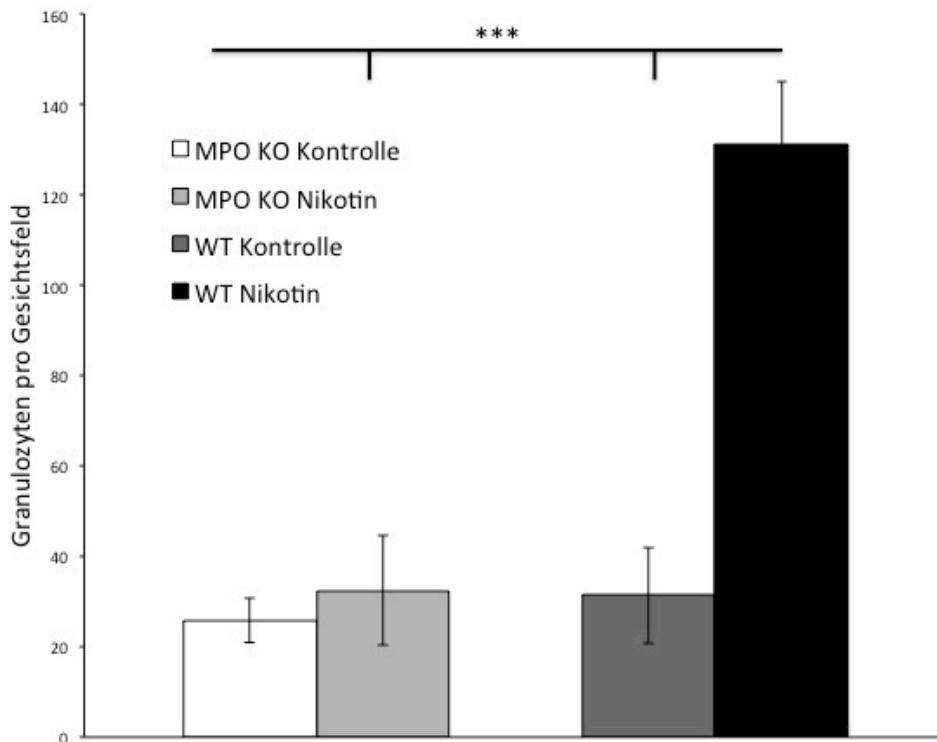


Abb. 17: **Immunhistochemisch quantifizierte pulmonale PMN-Akkumulation in der MPO-knockout Maus (MPO KO) und der Wildtyp Maus (WT).** Dargestellt ist die mittlere Anzahl immunhistochemisch gefärbter PMNs in den Lungenschnitten. Mittelwerte +/- SEM; Die Tiere erhielten Nikotin 3 mg/kg oder Ethanol in NaCl als Kontrolllösung durch intraperitoneale Injektion. Kontrolle = Ethanol in NaCl; $p < 0,05 \cong *$, $p < 0,01 \cong **$, $p < 0,001 \cong ***$

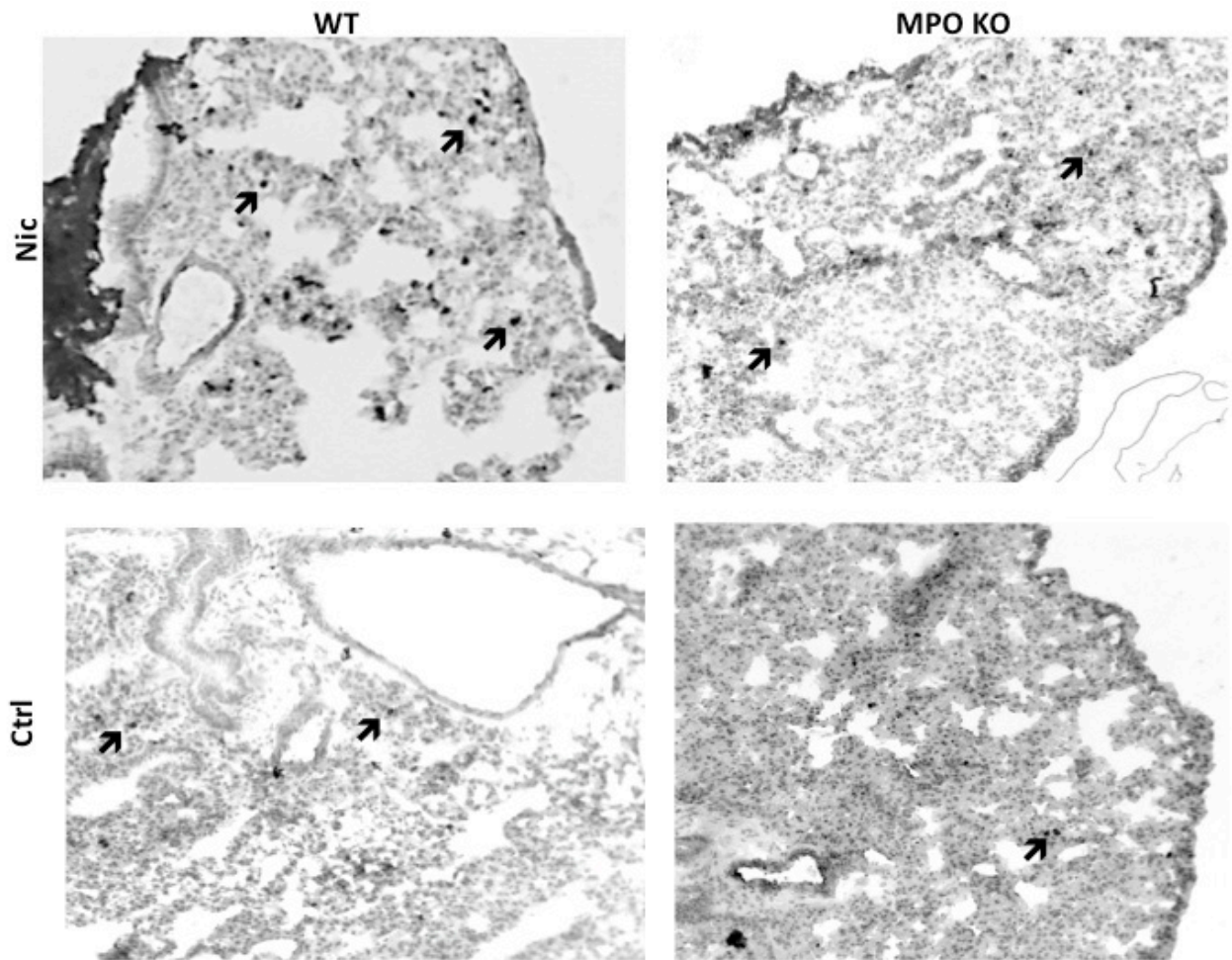


Abb. 18: **Immunhistochemische Färbung pulmonaler PMN-Akkumulation** (hier schwarz dargestellt und exemplarisch durch Pfeile gekennzeichnet) nach intraperitonealer Injektion von Nikotin (3mg/kg Körpergewicht) oder Kontrolllösung in der Wildtyp und MPO KO Maus. x 10. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ausschnitte. Die Pfeile markieren exemplarisch neutrophile Granulozyten.

3.4 Nikotin führt zur Verschlechterung der Endothelfunktion

3.4.1 Die Endothelfunktion der Wildtyp-Maus nach akuter Nikotinapplikation

Die Ermittlung einer möglichen Beeinflussung der Endothelfunktion durch Nikotin erfolgte im sogenannten Organbad. Mit Hilfe dieses etablierten Verfahrens konnte die Endothelfunktion von Aortenringen nikotinbehandelter und unbehandelter Tiere

verglichen werden. Die Messung der Endothelfunktion, genauer gesagt der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit, erfolgte nach Zugabe von Acetylcholin in aufsteigender Dosierung (LOG M -9 bis LOG M -5,5). Dabei stellte der zuvor eingestellte Ruhetonus eine Relaxation von 100% dar und die durch Prostaglandin E2 erwirkte Kontraktion die 0%-Relaxations-Marke.

Die Daten zeigen, dass sich die Aortenringe der zuvor mit Nikotin behandelten Tiere signifikant geringer durch Acetylcholin relaxieren lassen als die der unbehandelten Tiere. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Nikotin zu einer Verschlechterung der Endothelfunktion führt und konsekutiv die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit verringert.

Ach Konzentration	N	Mittelwert von %Relaxation	SEM	p
LOG -5,5 Ach WT Nic	11	-72,66	1,83	0,01
WT Ctrl	4	-85,32	5,11	
LOG -6,0 Ach WT Nic	11	-70,46	1,82	0,009
WT Ctrl	4	-83,56	5,29	
LOG -6,5 Ach WT Nic	11	-63,67	2,21	0,019
WT Ctrl	4	-77,27	6,06	
LOG -7,0 Ach WT Nic	11	-51,87	1,97	0,002
WT Ctrl	4	-66,76	3,82	
LOG -7,5 Ach WT Nic	11	-31,00	1,35	< 0,001
WT Ctrl	4	-44,49	2,39	
LOG -8,0 Ach WT Nic	11	-13,48	1,20	0,001
WT Ctrl	4	-23,10	2,11	
LOG -8,5 Ach WT Nic	11	-4,27	0,54	0,094
WT Ctrl	4	-6,27	1,07	

Tabelle 1: Die Tabelle zeigt die erreichten Relaxationswerte von WT Nikotin- und WT Kontrolltieren in Abhängigkeit der Acetylcholin-Konzentration.

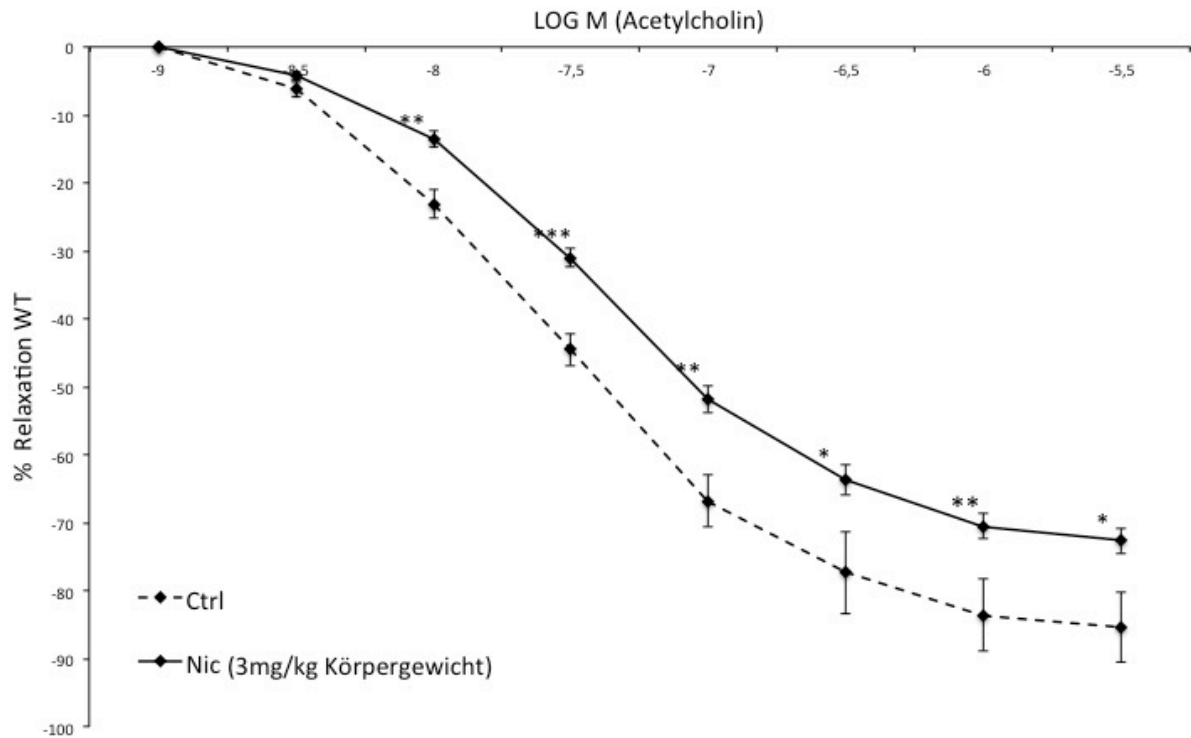


Abb. 19: **Endothelabhängige Relaxation des Aortenrings einer Wildtyp (WT) Maus unter Acetylcholin** Dargestellt sind die Relaxierungskurven von Aortenringen nikotinbehandelter (Nic; n=11) und unbehandelter (Ctrl; n=4) Mäuse in % der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Konstriktion unter ansteigender Acetylcholin-Konzentration (LOG M -9 bis -5,5). Mittelwerte +/- SEM; $p < 0,05 \cong *$, $p < 0,01 \cong **$, $p < 0,001 \cong ***$

Um zu überprüfen, ob der erzielte Unterschied tatsächlich das Resultat einer durch Acetylcholin bedingten endothelabhängigen Relaxation ist und nicht durch strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Ringen produziert wird, testet man die endothelunabhängige Relaxation durch Nitroglycerin.

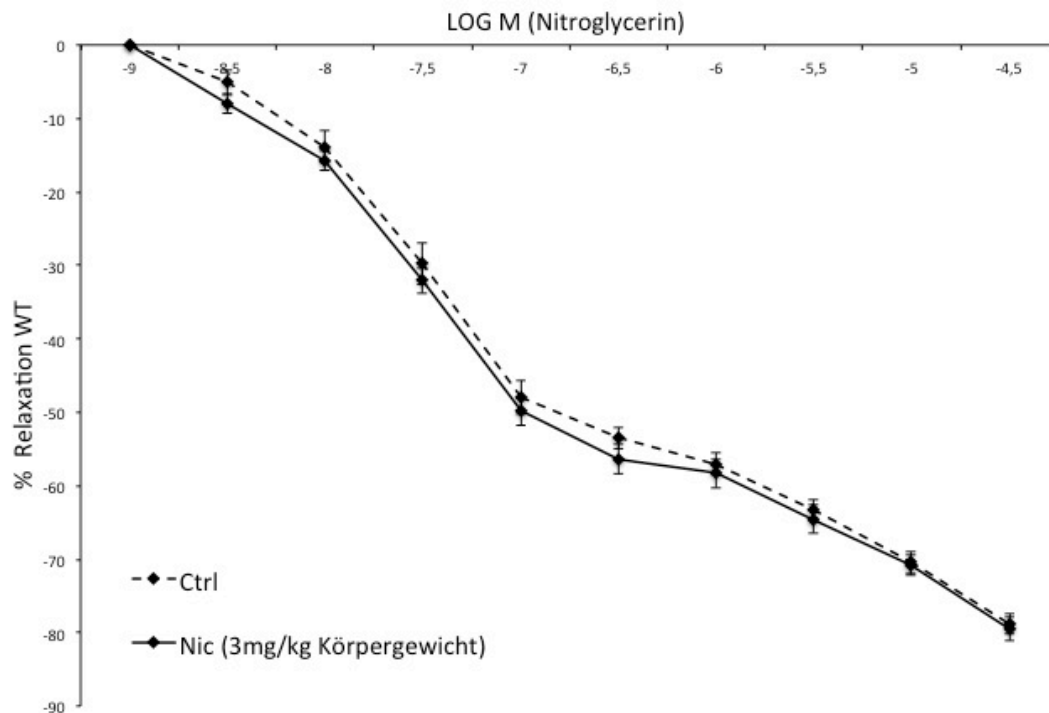


Abb. 20: **Endothelunabhängige Relaxation des Aortenrings einer Wildtyp (WT) Maus unter Nitroglycerin** Dargestellt sind die Relaxierungskurven von Aortenringen nikotinbehandelter (Nic; n=11) und unbehandelter (Ctrl; n=4) Mäuse in % der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Konstriktion unter ansteigender Nitroglycerin-Konzentration (LOG M -9 bis -4,5). Mittelwerte +/- SEM;

3.4.2 Die Endothelfunktion der MPO-KO-Maus nach akuter Nikotinapplikation

Um zu untersuchen, ob der beschriebene Effekt auf die Relaxationsfähigkeit des Endothels mit einer Nikotin-induzierten Freisetzung von MPO in Zusammenhang steht, wurde der Versuch ebenfalls mit Aorten aus MPO KO Mäusen durchgeführt. Es wurde angenommen, dass durch die Abwesenheit von MPO die Verfügbarkeit für NO im Endothel unverändert ist und folglich auch die Funktion der endothelabhängigen Relaxation erhalten bleibt. Es sollte sich dabei also kein Unterschied zwischen der Nikotin Gruppe und der Kontroll-Gruppe der KO Tiere ergeben.

Im Vergleich dieser beiden Gruppen zeigt sich wie erwartet keine signifikante Abweichung der Relaxation unter einer steigenden Ach-Konzentration. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Nikotin seine (negative) Wirkung auf das Endothel nur in Anwesenheit von MPO entfalten kann.

Ach Konzentration	N	Mittelwert von %Relaxation	SEM	p
LOG -5,5 Ach KO Nic	6	-69,92	1,74	0,19
KO Ctrl	6	-73,64	6,27	
LOG -6,0 Ach KO Nic	6	-67,36	2,73	0,20
KO Ctrl	6	-70,95	5,95	
LOG -6,5 Ach KO Nic	6	-61,58	3,00	0,15
KO Ctrl	6	-65,55	5,53	
LOG -7,0 Ach KO Nic	6	-50,08	4,55	0,16
KO Ctrl	6	-53,84	4,05	
LOG -7,5 Ach KO Nic	6	-29,22	5,49	0,14
KO Ctrl	6	-33,69	4,26	
LOG -8,0 Ach KO Nic	6	-12,81	5,28	0,25
KO Ctrl	6	-15,83	3,17	
LOG -8,5 Ach KO Nic	6	-4,68	3,91	0,67
KO Ctrl	6	-3,95	1,49	

Tabelle 2: Die Tabelle zeigt die erreichten Relaxationswerte von Nikotin- und Kontrolltieren der MPO KO Population in Abhängigkeit der Acetylcholin-Konzentration.

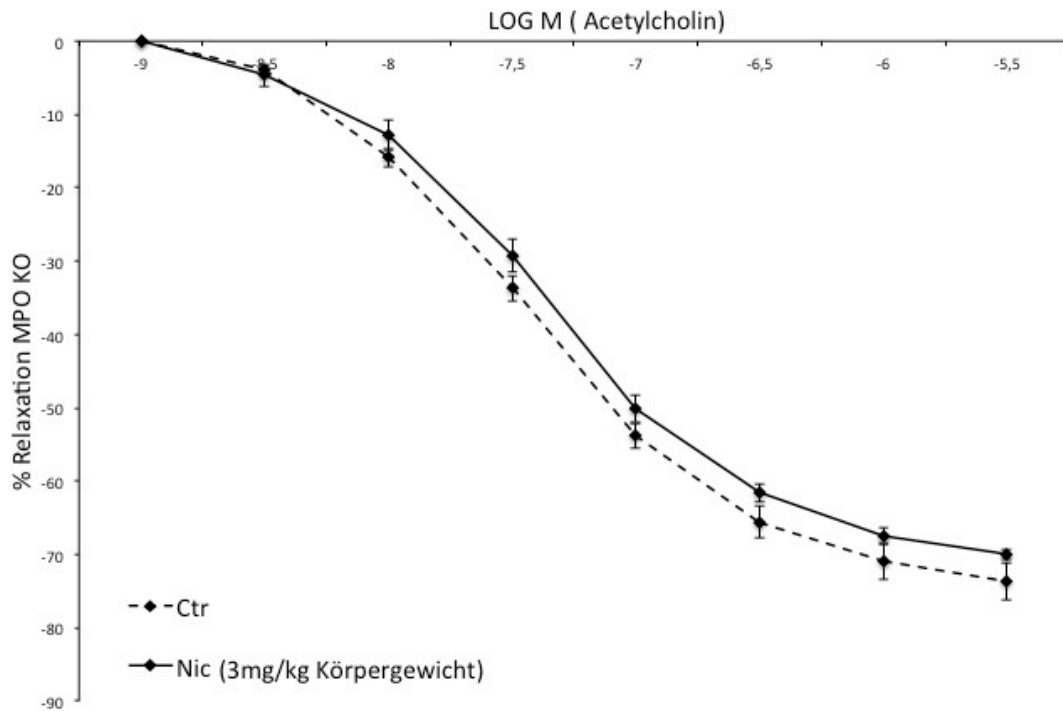


Abb. 21: **Endothelabhängige Relaxation des Aortenrings einer MPO Knock Out (MPO KO) Maus unter Acetylcholin** Dargestellt sind die Relaxierungskurven von Aortenringen nikotinbehandelter (Nic; n=6) und unbehandelter (Ctrl; n=6) KO Mäuse in % der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Konstriktion unter ansteigender Acetylcholin-Konzentration (LOG M -9 bis -5,5). Mittelwerte +/- SEM;

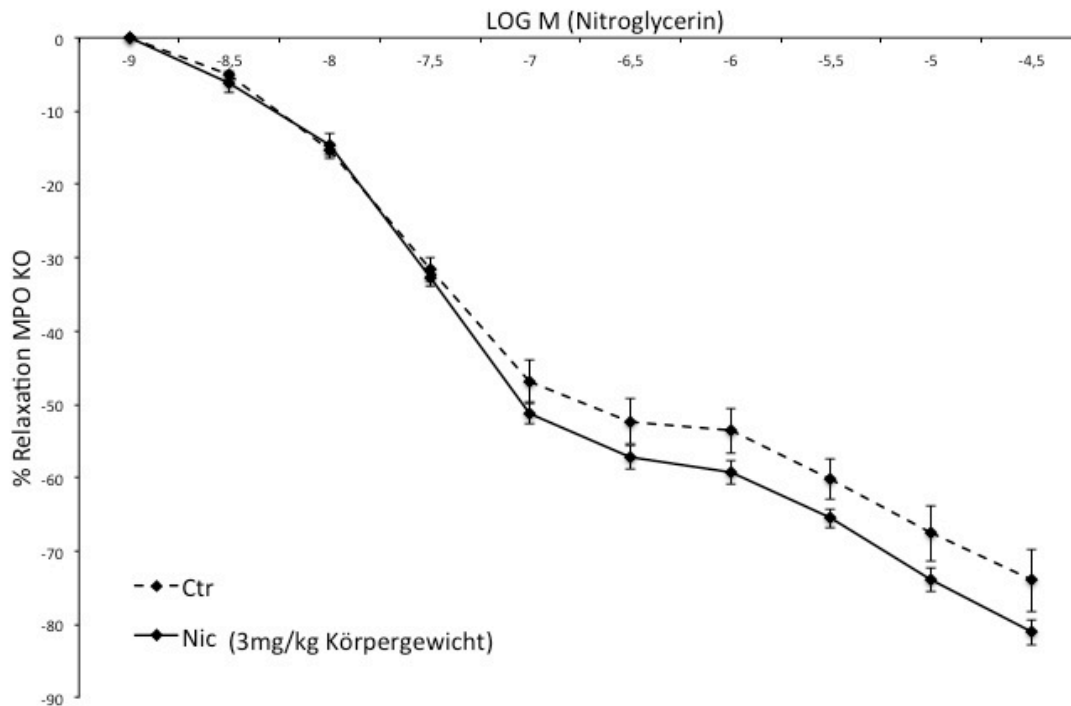


Abb. 22: **Endothelunabhängige Relaxation des Aortenrings einer MPO Knock Out (MPO KO) Maus unter Nitroglycerin** Dargestellt sind die Relaxierungskurven von Aortenringen nikotinbehandelter (Nic; n=11) und unbehandelter (Ctrl; n=4) Mäuse in % der $PGF_{2\alpha}$ -induzierten Konstriktion unter ansteigender Nitroglycerin-Konzentration (LOG M -9 bis -4,5). Mittelwerte +/- SEM;

3.4.3 Unterschiede zwischen Wildtyp und MPO KO: Die MPO-Abhängigkeit der Endothelfunktion

Um den Unterschied zwischen den Mauspopulationen besser darzustellen und damit die MPO-Abhängigkeit der nikotinvermittelten Einschränkung der Relaxationsfähigkeit zu verdeutlichen, wurden beide Gruppen gegenüber gestellt.

Im ersten Schritt wurden die Differenzen (Delta) der erzielten Relaxationswerte (Kontrolle minus Nikotin; hier als Delta WT oder Delta KO bezeichnet) innerhalb der

Populationen berechnet und wie in Abbildung 19 in Abhängigkeit der AcetylcholinKonzentration dargestellt. Dabei geben die Werte den Unterschied des Relaxierungsgrades zwischen Kontrolle und Nikotin wieder. Ein großer Balken bedeutet demnach einen großen Unterschied. Die Einheit % bleibt erhalten. Hier zeigt sich bereits, dass die Unterschiede in der Wildtyp-Population deutlich stärker ausgeprägt sind.

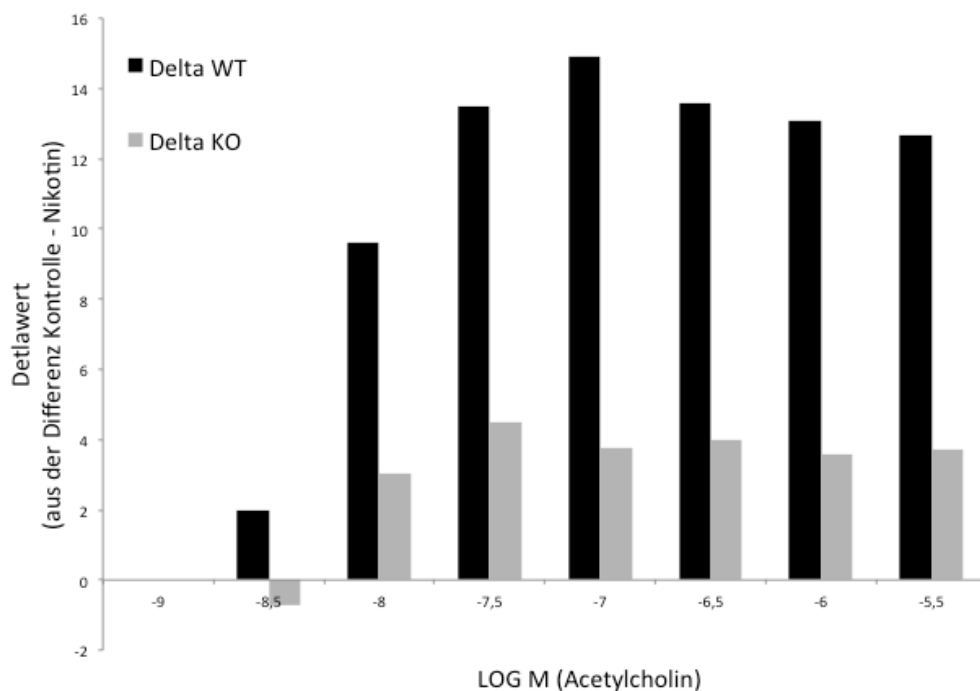


Abb. 23: **Differenzen (Delta) der erzielten Relaxationswerte**, gebildet aus Kontrollwert minus Nikotinwert innerhalb der verschiedenen Populationen, hier als Delta WT (Wildtyp) und Delta KO (Knock Out). Dargestellt sind die Deltawerte in ihrer ursprünglichen Einheit % Relaxation; ermittelt aus den Werten der jeweiligen Ach-Konzentration (LOG M -8,5 bis -5,5).

Im zweiten Schritt wurden die Deltawerte einer Population gemittelt. Der berechnete Wert gibt also den mittleren Unterschied zwischen Kontrolle und Nikotin einer Population an und spiegelt die nikotinbedingte Einschränkung der Dilatation wider. Hier zeigt sich, dass sich der Wert der Wildtyp Population signifikant von dem der KO Tiere unterscheidet. Auf Grund von MPO kommt es in Wildtyp Tiere zu einer signifikant größeren Einschränkung der Dilatation als dies in KO Tieren der Fall ist (gemittelt Delta WT 9,92%; gemittelt Delta KO 2,72%; $p = 0,001$).

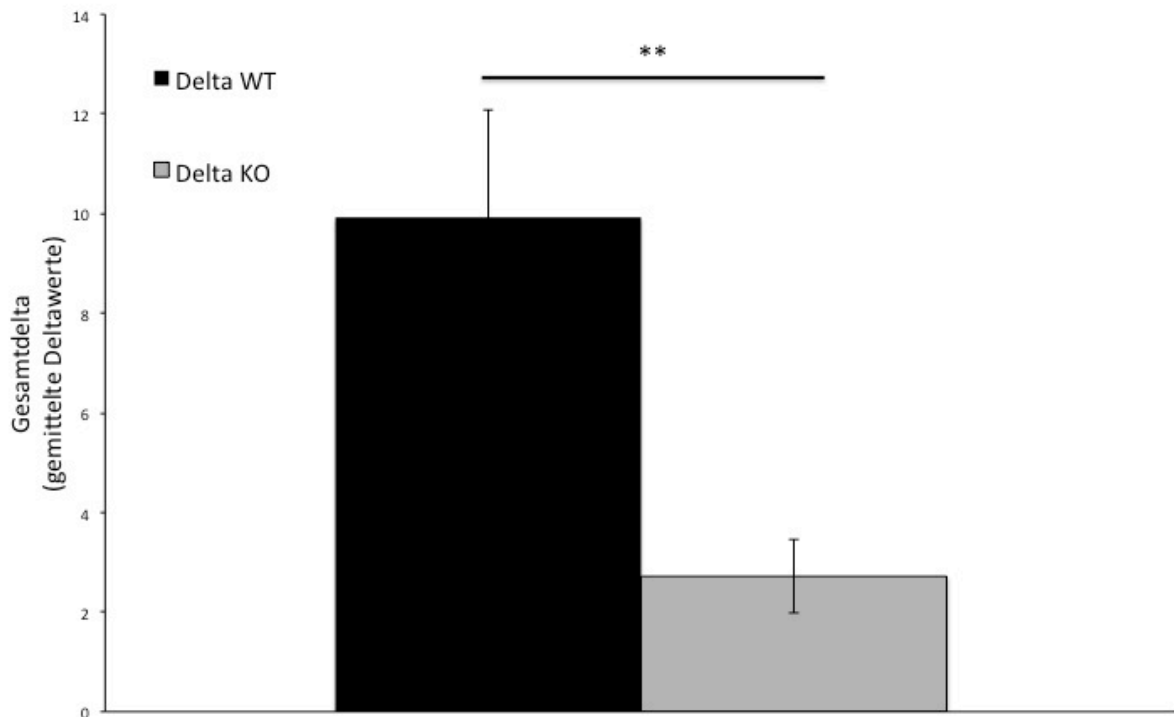


Abb. 24: **Gemittelte Differenzen (Gesamtdelta) der erzielten Relaxationswerte der MPO Knock Out-Maus und der Wildtyp-Maus**; gebildet aus allen Deltawerten der jeweiligen Mauspopulation. Die ursprüngliche Einheit % Relaxation bleibt erhalten. $p < 0,05 \cong *$, $p < 0,01 \cong **$, $p < 0,001 \cong ***$

3.4.4 Fluss und Fließgeschwindigkeit nach chronischer Nikotinapplikation

In einem weiteren Tierversuch wurde untersucht, ob eine Nikotinbehandlung auch *in vivo* zu einer Abnahme der Relaxationsfähigkeit und somit zur Abnahme von Blutfluss und Fließgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation führt.

Bei diesem Versuch kam das O2C Gerät der Firma LEA Medizintechnik Giessen zum Einsatz. Es kombiniert das Dopplerverfahren zur Bestimmung von Blutfluss und Fließgeschwindigkeit mit einer zusätzlichen Weißlichtquelle zur Bestimmung von Blutparametern wie der Sauerstoffsättigung.

Die Sonde ermittelte die Parameter der Mikrozirkulation, indem sie direkt auf den freipräparierten Oberschenkelmuskel der Maus platziert wurde. Zuvor wurde die Maus über eine (unter die Haut) implantierte osmotische Minipumpe für einen Zeitraum von 7 Tagen kontinuierlich mit Nikotin behandelt.

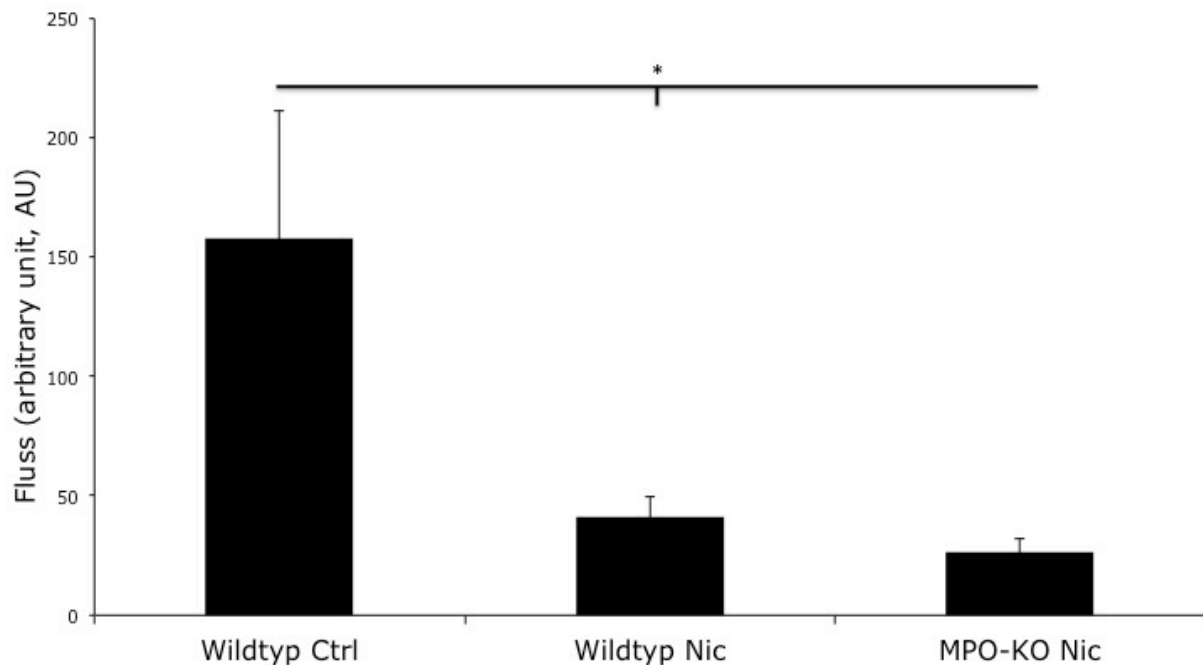


Abb. 25: **Blutfluss in der Mikrozirkulation des Oberschenkelmuskels bei Wildtyp-Mäusen ohne Nikotinbehandlung (Wildtyp Ctrl) und Wildtyp- und MPO-KO Mäusen nach Nikotinbehandlung (Wildtyp Nic, MPO-KO Nic).** Die Daten werden mit einer sog. arbitrary unit (AU) angegeben. Einer vom Hersteller unskalierten, willkürlichen Einheit. Mittelwerte +/- SEM; $p < 0,05 \cong *$, $p < 0,01 \cong **$, $p < 0,001 \cong ***$

Die Daten zeigen eine signifikante Minderung von Fluss und Fließgeschwindigkeit innerhalb der Mikrozirkulation der „Nikotintiere“ (Flow 41,28±/10, $p=0,016$; Velocity 13,06±/1, $p=0,003$) im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Tieren (Flow 157,62±/71, Velocity 22,83±/4).

Nikotin verursacht offensichtlich eine Abnahme von Fluss und Fließgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation der Maus. Damit würden sich die Ergebnisse des

Organbadversuchs auch im lebenden Organismus bestätigten, wonach Nikotin zu einer verminderten Relaxationsfähigkeit führt.

Einzig die Ergebnisse der MPO KO Tiere zeigten nicht den zu erwartenden Effekt. Die ebenfalls mit Nikotin behandelten MPO KO Mäuse hatten einen ähnlich verminderten Fluss (29,85+/-5) und Fließgeschwindigkeit(11,21+/-0,6) wie die behandelten Tiere der Wildtyp Population (im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle p=0,012; p=0,001). Diese Ergebnisse können nicht im Kontext mit den vorangehenden Erkenntnissen erklärt werden, da angenommen wird, dass MPO ein wesentlicher Mediator der Gefäßfunktion im Hinblick auf Nikotin ist und die Abwesenheit des Enzyms die Funktion deshalb unbeeinflusst lassen müsste .

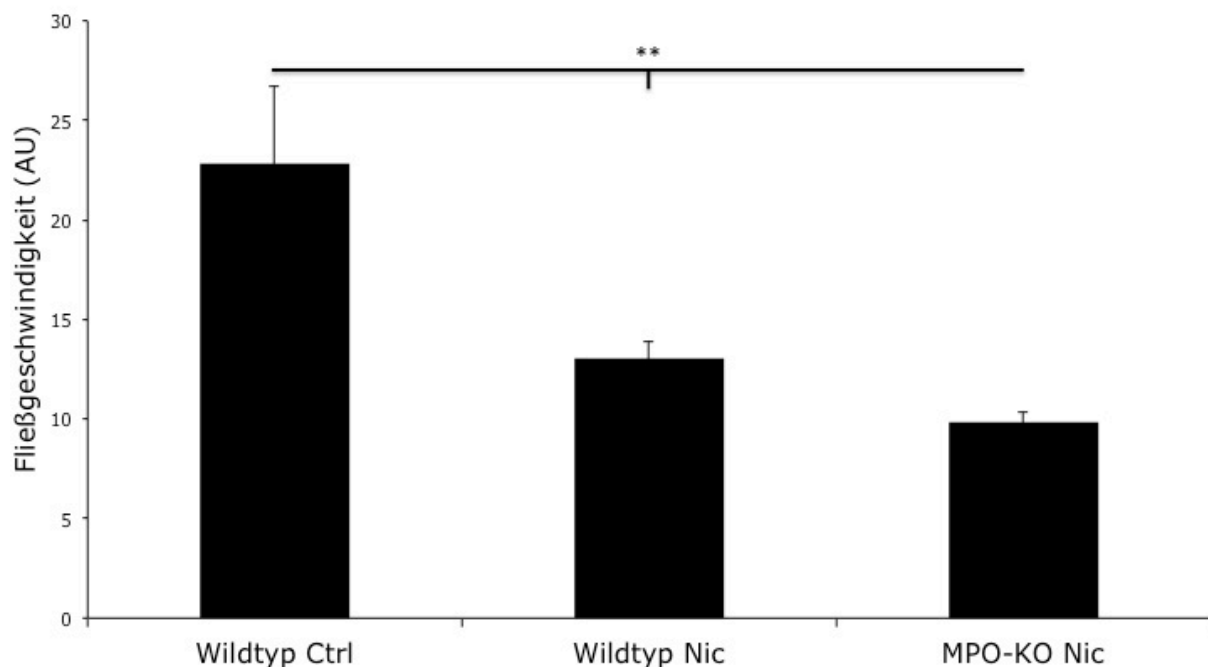


Abb. 26: **Fließgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation des Oberschenkelmuskels bei Wildtyp-Mäusen ohne Nikotinbehandlung (Wildtyp Ctrl) und Wildtyp- und MPO-KO Mäusen nach Nikotinbehandlung (Wildtyp Nic, MPO-KO Nic).** Die Daten werden mit einer sog. arbitrary unit (AU) angegeben. Mittelwerte +/- SEM; $p < 0,05 \cong *$, $p < 0,005 \cong **$, $p < 0,0005 \cong ***$

4 Diskussion

Nikotin, das Hauptalkaloid der Tabakpflanze und wichtigster Bestandteil von Zigaretten, ist nachweislich für eine Vielzahl schädlicher Wirkungen auf den menschlichen Organismus verantwortlich. Vor allem bei der Entwicklung von Herz-Kreislaufkrankungen scheint es eine wichtige Rolle zu spielen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nikotin einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion nimmt und dadurch möglicherweise zur Initiierung und Entwicklung der Arteriosklerose beiträgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten auch einen Zusammenhang zwischen den proinflammatorischen und damit proarteriosklerotischen Effekten von Nikotin und dem Enzym Myeloperoxidase aufzeigen. Dabei scheint MPO eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung des Nikotineffekts zu spielen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit aktuellen Erkenntnissen der Wissenschaft diskutiert und eingeordnet werden.

4.1 Nikotin - aktivierender oder hemmender Einfluss

Alle Versuche dieser Arbeit basieren auf der Annahme, Nikotin habe einen aktivierenden Effekt auf neutrophile Granulozyten. So sind die hier unter anderem untersuchten Vorgänge der Adhäsion, Degranulation und Rekrutierung allesamt aktive Prozesse der Zelle und bedingen eine vorangehende Aktivierung. In der Literatur finden sich dazu zahlreiche Beispiele. Wie bereits einleitend beschrieben, kann Nikotin neutrophile Granulozyten aktivieren, chemotaktisch dirigieren (Totti u. a. 1984), sowie zur Adhäsion (Overbeek u. a. 2011) (Yong, Zheng, und Linthicum 1997) und Degranulation bewegen. Dabei werden nicht nur MPO und Elastase freigesetzt (Lavi u. a. 2007) sondern auch proinflammatorischen Eikosanoide (Seow u. a. 1994), Superoxid und IL-8 (Iho u. a. 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit reihen sich somit als logische Folge der Zellaktivierung in die Kette bereits bekannter Nikotinwirkungen ein. Es konnte von uns gezeigt werden, dass Nikotin die Adhäsion neutrophiler Granulozyten induziert und konzentrationsabhängig steigert, sowie die Degranulation der Granulozyten und somit die Freisetzung von MPO bewirkt. Im Tierversuch konnte eine MPO-Abhängigkeit der Nikotinwirkung nachgewiesen werden. Sowohl die gesteigerte

Infiltration/Rekrutierung als auch die Verschlechterung der Endothelfunktion durch Nikotin konnten als MPO-abhängige Prozesse identifiziert werden.

Jedoch existieren auch Arbeitsgruppen, die Gegenteiliges beobachten und gar einen antiinflammatorischen Effekt von Nikotin postulieren. Gerade die Interaktion der Granulozyten mit dem Endothel im Rahmen der Adhäsion ist vielfach untersucht worden. So konnte ebenso gezeigt werden, dass Nikotin die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel hemmt und konsekutiv die Migration unterdrückt (Saeed u. a. 2005). Diese untersuchten Effekte scheinen hauptsächlich durch den $\alpha 7 n A c h R$ vermittelte Signale zu sein. Aber auch die verminderte Produktion von Zytokinen durch Nikotin (Hosur u. a. 2009) trägt zu einem eher antiinflammatorischen Bild bei. Bei Untersuchungen mit Granulozyten konnten Arbeitsgruppen um Bridges und um Corberand (Bridges u. a. 1977; Corberand u. a. 1980) keinen oder einen sogar eher hemmenden Effekt von Nikotin auf die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten feststellen. Husten und Kollegen untersuchten eine durch Nikotin reduzierte CD11b Präsentation (Huston u. a. 2009). Eine weitere Arbeit konnte sogar zeigen, dass die Ausbildung der Integrine durch höhere Nikotin-Konzentrationen ab etwa $10 \mu\text{mol/l}$ komplett unterdrückt wurde (Speer u. a. 2002).

Viele dieser Beobachtungen beruhen vermutlich auf cholinergen, antiinflammatorischen Signalwegen des Parasympathikus und dessen Haupttransmitter Acetylcholin (ACh). Als verantwortlicher Rezeptor für die Übertragung antiinflammatorischer Signale konnte u. a. der $\alpha 7 n A c h R$ auf immunkompetenten Zellen identifiziert werden. Das parasympatische Nervensystem reguliert periphere Entzündungsreaktionen durch einen Regelkreis, welcher in der Literatur als „anti-inflammatorischer Reflex“ (CAIR) bezeichnet wird. Demnach binden die bei der Entzündungsreaktion freigesetzten Zytokine zu Rezeptoren des afferenten parasympatischen (vagalen) Nervensystems und führen zu einer Aktivierung dieser Fasern. Durch Verschaltungen im ZNS kommt es über efferente Vagusfasern zu einer Ausschüttung von ACh im entzündeten Gewebe. Das freigesetzte ACh bindet an den $\alpha 7 n A c h R$ auf Gewebsmacrophagen und hemmt dadurch die weitere Produktion proinflammatorischer Zytokine (Wang u. a. 2003; Tracey 2009). Wilund u. a. konnten mittels eines $\alpha 7 n A c h R$ -KO-Mausmodells zeigen, dass ein Defizit des Rezeptors die antioxidativen Kapazitäten von Gewebsmacrophagen signifikant reduziert, darüber hinaus die Macrophagen dazu veranlasst, vermehrt oxidiertes LDL aufzunehmen, sowie

die Cholesterol Akkumulation in der Gefäßwand steigert und so die Schaumzellbildung beschleunigt. Darüber hinaus kam es bei den KO-Tieren zu einem generellen Anstieg systemischer Entzündungsparameter wie dem CRP.

Jedoch, gegen die rein antiinflammatorisch/antiatherogene Funktion des Rezeptors sprechen beispielsweise die Ergebnisse von Aicher u. a. (Aicher u. a. 2003), wonach Nikotin via $\alpha 7nAChR$ dendritische Zellen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und IL-12 anregt, was wiederum die Interaktion dieser Zellen mit T-Zellen begünstigt. Andere Arbeitsgruppen konnten eine Steigerung der Plättchenaktivierung und Aggregation (Schedel u. a. 2011), sowie eine gesteigerte Plauevaskularisierung (Cooke 2007; Cooke und Ghebremariam 2008), vermittelt durch den Rezeptor, nachweisen.

Der exakte Mechanismus, durch welchen Nikotin seine pro- beziehungsweise antiinflammatorischen Wirkungen entfaltet, bleibt jedoch unvollständig geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Genauer müssen die Funktionen der spezifischen Rezeptorsubtypen untersucht werden, um in der Zukunft gezielt Therapien in diese Richtung entwickeln zu können.

4.2 Nikotinkonzentration im Versuch

Die Wahl der richtigen Konzentration ist ausschlaggebend für das Ergebnis und kann dieses stark beeinflussen. Wie bereits beschrieben, liegt die Menge Nikotin, die nach dem Rauchen einer Zigarette im Blut messbar ist, etwa zwischen 0,3 und 0,6 μM und damit beispielsweise deutlich unterhalb der von uns verwendeten Konzentration im Adhäsionsversuch (1mM). Die „richtige“ Konzentration, wie sie im menschlichen Körper nach dem Tabakkonsum vorkommt, ist dabei aber nur schwer festzulegen. Sie ist von vielen Faktoren wie beispielsweise dem Stoffwechsel (männlich vs. weiblich), dem Rauchverhalten (Tiefe der Inhalation, Anzahl der Züge, Anzahl der Zigaretten) oder der Lokalisation im Körper abhängig (Hukkanen, Jacob, und Benowitz 2005b). So sind zum Beispiel die Nikotinkonzentration im Speichel nach drei Zigaretten mit 360 $\mu g/ml$ bis zu siebenmal höher als im Plasma (Feyerabend, Higenbottam, und Russell 1982; Russell, Feyerabend, und Cole 1976; P. Jacob 3rd, Wilson, und Benowitz 1981) oder die Nikotinkonzentration im arteriellen Blut 6-10 mal und im Gewebe 2-3 mal höher als die

Werte gemessen im venösen Blut ($0,5 \times 10^{-7} \text{M}$ bis $5,0 \times 10^{-7} \text{M}$) (Scott und Palmer 2002). Bei der Verwendung von humanen Granulozyten spielt es auch eine Rolle, ob der Spender selbst aktiver oder passiver Raucher ist, weil dadurch der Rezeptorstatus auf den Granulozyten beeinflusst wird (Benhammou u. a. 2000). Zwar wurde darauf geachtet, nur Blut von gesunden Nichtrauchern zu verwenden, aber eine passive Belastung ist dadurch nicht ausgeschlossen.

Die von uns verwendete Konzentration bei Versuchen mit menschlichen Spenderzellen resultierte aus einer Reihe von Vorversuchen, um eine geeignete Dosis zu finden. Bei einem *in vitro* Versuch mit isolierten Granulozyten kommt es verfahrensbedingt zu einer mehr oder weniger starken Voraktivierung der Granulozyten, wie sie im menschlichen Körper nicht vorliegt. Dieses Phänomen ist allgemein bekannt. Um dem entgegenzusteuern, verwenden manche Arbeitsgruppen im Tierversuch Natriumcromoglicat, einen Mastzellstabilisator, der die Voraktivierung verhindern soll (Yong, Zheng, und Linthicum 1997). Dies lässt sich bei menschlichen Spendern nicht umsetzen. Die Voraktivierung mag ein Grund dafür sein, dass es für eine weitere Aktivitätsteigerung der Granulozyten eines sehr großen Stimulus in Form einer unnatürlich hohen Nikotinkonzentration, wie wir sie in den Zellversuchen verwendet haben, bedarf.

Im Tierversuch spielen eine Reihe weiterer Faktoren eine wichtige Rolle bei der Wahl einer geeigneten Konzentration. Wir orientierten uns an Richtwerten wie sie in der Literatur als allgemeiner Konsens zu finden waren. Wir verwendeten eine Nikotinkonzentration von 3 mg/kg. Diese relativ hohe Konzentration begründet sich durch die Tatsache, dass Tiere im Allgemeinen Nikotin wesentlich schneller metabolisieren als Menschen (Gorrod and Jenner 1975; Scheline 1978;) (Seaton und Vesell 1993). So hat Nikotin in der Maus nur eine relativ kurze Plasma-Halbwertszeit von 6-7 Minuten. Außerdem spielte die Art der Applikation eine entscheidende Rolle. Durch den sehr hohen First Pass Effekt werden annähernd 70% des intraperitoneal injizierten Nikotins umgehend metabolisiert. Diese Gründe erfordern eine höhere Nikotindosierung im Tierversuch.

Neben der Gattung und den Enzymsystemen beeinflussen auch Faktoren wie das Alter oder das Geschlecht den Metabolismus. So läuft der Stoffwechsel bei weiblichen Individuen schneller ab als bei männlichen (N. L. Benowitz u. a. 2006) und im Alter ist der Metabolismus gegenüber jungen Individuen verlangsamt (Molander, Hansson, und

Lunell 2001). Auch Stress hat einen beschleunigenden Einfluss auf die Metabolisierung, dies gilt insbesondere für den Tierversuch.

4.3 Die Bedeutung des Nikotins für die Adhäsion

Die feste Adhäsion der Leukozyten ist ein essentieller Schritt innerhalb der Aktivierungs- und Rekrutierungskaskade dieser Zellen und geht der Durchwanderung des Endothels voraus. Sie stellt damit ein zentrales Element der Thematik dar, welche unserer Hypothese zugrunde liegt, nämlich der Leukozytenaktivierung und Rekrutierung durch Nikotin. Zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen identifizierten Nikotin bereits als einen möglichen Aktivator und Initiator der Adhäsion (Overbeek u. a. 2011). Für das Projekt war deshalb die Wiederholbarkeit der Ergebnisse unbedingt erforderlich.

Im Blut von Rauchern zirkuliert nachweislich nicht nur eine gesteigerte Anzahl weißer Blutkörperchen, sondern es finden sich darunter auch vermehrt aktivierte Leukozyten (Lavi u. a. 2007). Dies begründet sich möglicherweise durch die aktivierende Wirkung von Nikotin. Ebenso ist bekannt, dass Nikotin dazu beiträgt, dass auf dem Endothel vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert werden und dadurch die Adhäsion des PMN ermöglicht wird (Cirillo u. a. 2007; Hu u. a. 2009; Ueno u. a. 2006) (Kalra u. a. 1994; Blann, Steele, und McCollum 1997; Shen u. a. 1996)(Yong, Zheng, und Linthicum 1997).

Allerdings ist die feste Adhäsion ein Zusammenspiel von Endothel und Granulozyt, welches neben dem aktivierten Granulozyten auch ein aktiviertes Endothel erfordert. Die Aktivierung der Zelle erfolgt normalerweise durch inflammatorische Mediatoren wie Chemokine, Leukotriene und Formylpeptide, aber auch durch granulozyteneigene MPO (Lau u. a. 2005) oder Nikotin (Totti u. a. 1984). Sie verursacht eine Konformationsänderung der granulozytären Adhäsionsmoleküle CD11b/CD18 (Ley K: Adhesion Molecules: Function and Inhibition. Basel: Birkhauser Verlag Basel/Schweiz. XIV 2007). Daraus resultiert eine gesteigerte Bindungsfähigkeit, unter anderem zu dem endothelialen Adhäsionsmolekül ICAM-1, aber auch zu dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin (FN), einem Strukturprotein, welches gehäuft in der subendothelialen Raum vorkommt und eine wichtige Rolle bei der Migration des Granulozyten spielt.

Wir konnten zeigen, dass Nikotin *in vitro* die Adhäsion der Granulozyten zu dem Protein Fibronectin steigern kann. Dabei wurde die Nikotinwirkung scheinbar durch den nACh-Rezeptor vermittelt, da eine unspezifische Blockade des Rezeptor mittels Pancuronium (Wenningmann und Dilger 2001) eine adhäsionssteigernde Wirkung verhinderte. Andere Arbeitsgruppen verwendeten Mecamylamine als nAChR Antagonist (ZB Yong 97;). Die Bindung an den Rezeptor veranlasst diesen zur Öffnung seines Ionenkanals und zum Einstrom von Calciumionen. Die dadurch verursachte Erhöhung des intrazellulären Calciums konnte sowohl bei Granulozyten als auch bei Endothelzellen gemessen werden (Ryder 1994; Zia u. a. 1997). Ca^{2+} ist ein bedeutendes *second messenger* Molekül und für eine Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden verantwortlich. Beispielsweise konnte (Southwick u. a. 1989) feststellen, dass ein Zusammenhang zwischen der für die Migration notwendigen F-Aktin Polymerisation und dem erwähnten Ca^{2+} - Einstrom besteht. Ueno u. a. konnten zeigen, dass Nikotin über den Calciumeinstrom die Proteinkinase C aktiviert und daraufhin vermehrt VCAM/ICAM auf Endothelzellen exprimiert werden (Ueno u. a. 2006). Eventuell führt eine nikotininduzierte Calciumerhöhung im Granulozyten zu einer F-Aktin Polymerisation (Ryder 1994) und dadurch zu einer Veränderung zytoskeletaler Strukturen. Dies kann, vermittelt über Verbindungsproteine eventuell eine Konformationsänderung und gesteigerte Präsentation von CD11b auf der Oberfläche der Granulozyten bewirken (Huston u. a. 2009)(Anderson, Hotchin, und Nash 2000). Das würde wiederum die gesteigerte Adhäsion erklären. Dagegen sprechen allerdings die Ergebnisse von (Huston u. a. 2009), die erklären, dass durch Nikotin die F Aktin Polymerisation unterdrückt wird und es dadurch nicht zur Adhäsion kommt. In unserem Experiment wurde lediglich die Adhäsion unter Nikotineinfluss beurteilt, ohne eine mögliche Expressionssteigerung oder Konformationsänderung der Integrine zu untersuchen. Dieser Zusammenhang muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

4.4 Die Bedeutung des Nikotins für die Degranulation

Um ihre unterschiedlichen Funktionen ausüben zu können, verfügen Granulozyten über eine Vielzahl an Enzymen und anderen Stoffen, die innerhalb des Granulozyten in sogenannten Granula gespeichert werden. Man unterscheidet spezifische, sekundäre

Granula, die zum Beispiel Lysozym und Kollagenasen wie die MMP-9 enthalten, von den primären, azurophilen Granula. Letztere setzen bei Degranulation MPO und Elastase frei (Winterbourn, Vissers, und Kettle 2000; Lau und Baldus 2006). Das Nikotin allgemein eine Degranulation des Leukozyten bewirken kann, ist in der Literatur zahlreich bestätigt worden. So führt Nikotin zur Freisetzung von MMP-9 (Xu u. a. 2008; Birkedal-Hansen u. a. 1993), Elastase und beta-Glucuronidase aus azurophilen Granula (Janoff, Raju, und Dearing 1983; Ludwig und Hoidal 1982; Seow u. a. 1994) sowie IL-8 (Iho u. a. 2003).

Laut unserer Hypothese ist MPO aus azurophilen Granula wesentlich an der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion beteiligt. Der proinflammatorischen Wirkung von MPO geht dessen Freisetzung in den extrazellulären Raum voraus. Wir untersuchten deshalb im Tierversuch ob Nikotin in der Lage war, die Granulozyten zu aktivieren und dadurch eine Freisetzung des Enzyms zu bewirken. Ein wichtiger Hinweis auf eine mögliche Degranulation durch Nikotin lieferten erhöhte MPO-Plasmaspiegel im Blut von Rauchern (Lavi u. a. 2007) nach Nikotin-Zufuhr mittels Nikotin-Kaugummis (Rudolph u. a. 2011). Erste Untersuchungen des Plasmas nikotinbehandelter Mäuse zeigten keine Erhöhung des MPO Spiegels gegenüber den unbehandelten Tieren (Ergebnisse sind in dieser Arbeit nicht vorgestellt.) Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass MPO nach der Freisetzung an Heparansulfat-Glucosaminoglycane (GAG) auf der Oberfläche der Endothelzellen bindet (Daphna u. a. 1998) (Buffon u. a. 2002; Lau und Baldus 2006) Um dies zu überprüfen, verwendeten wir unfraktioniertes Heparin. Heparin konkurriert mit endothelialen Bindungsstellen um die Bindung zu MPO (Hiebert und Jaques 1976) und ist in der Lage, nicht nur die Bindung von MPO an das Endothel und an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin zu verhindern, sondern auch bereits gebundenes MPO zu lösen (S Baldus u. a. 2001; Jason P Eiserich u. a. 2002) (Rudolph u. a. 2010). Mit diesem Hintergrund wurde in einem weiteren Durchgang ein explantiertes Mäuseherz einer mit Nikotin vorbehandelten Maus mit Heparin gespült und die Spüllösung auf MPO untersucht. Hier zeigte sich eine deutliche Steigerung des MPO Gehalts gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Damit konnten wir indirekt die MPO-freisetzende Wirkung von Nikotin bestätigen.

4.5 Die Bedeutung von Nikotin für die Infiltration/Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Gewebe

Die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten zur Rekrutierung und Infiltration ist ein wesentlicher Bestandteil des Immunsystems. Nur dadurch ist es den Zellen möglich, Gewebeschäden und Pathogene an ihrem Entstehungsort zu bekämpfen. Aber auch unabhängig vom Immunsystem können verschiedene Stimuli eine Rekrutierung und Infiltration neutrophiler Granulozyten bewirken. Dazu zählt das Nikotin, welches über den Zigarettenrauch in die Lunge und das Blut aufgenommen wird. Dabei bildet das Lungengewebe von Rauchern ein primäres Ziel des Granulozyten. Das Lungengewebe weist eine der höchsten Gewebeaffinitäten für Nikotin im gesamten Körper auf (Matta u. a. 2007). Die Lunge hat nicht nur als eines der ersten Organe Kontakt mit Zigarettenrauch und dem darin enthaltenen Nikotin, sie ist auch eines der am stärksten durchbluteten Organe des menschlichen Körpers mit einer Ruheperfusion von ca. 5-6 l/min. Auf Grund der sehr großen Gasaustauschfläche der Lunge und der hohen Durchblutung kommt es im Lungenkreislauf zu sehr hohen Nikotinkonzentrationen (Matta u. a. 2007), was wiederum einen großen Stimulus darstellt. Wir untersuchten Lungenschnitte von nikotinbehandelten sowie unbehandelten Wildtyp- und MPO-KO-Tieren. Das Lungengewebe der nikotinbehandelten WT-Tiere wies eine deutlich höhere Anzahl neutrophiler Granulozyten auf als das unbehandelter Mäuse. Dafür können mehrere Gründe in Frage kommen.

Es ist bekannt, dass sich Granulozyten während des Rauchens unter Einfluss von Nikotin vermehrt in der Mikrozirkulation der Lunge sammeln (MacNee u. a. 1989; Scott und Palmer 2002) und dort aktiviert, Elastase und andere Enzyme durch Degranulation freisetzen (Klut u. a. 1993; Xu u. a. 2008). Dabei sind die spezifischen Funktionen des Granulozyten, die zur Infiltration/Rekrutierung notwendig sind, wie beispielsweise die Chemotaxis, stark konzentrationsabhängig. In niedrigen Konzentrationen, wie sie etwa im Plasma nach dem Rauchen einer Zigarette vorkommen, wirkt Nikotin chemotaktisch (Totti u. a. 1984; Nowak, Ruta, und Piasecka 1990), verursacht aber keine Degranulation. Für Nikotin in hohen Konzentrationen, wie man sie eventuell in der Lunge und im Speichel findet, verhält es sich genau umgekehrt. Hohe Konzentrationen führen zur Degranulation, hemmen aber Chemotaxis und Phagozytose (Seow u. a. 1994). Diese konzentrationsabhängigen Wirkungen lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass es unter hohen Konzentrationen zu einer stark gesteigerten F-Aktin

Polymerisation ohne die dynamische Konversion zu G-Aktin durch Nikotin kommt und dadurch der F-Aktin Pool gegenüber dem G-Aktin Pool stark vergrößert wird. Dies führt dazu, dass der Granulozyt nur noch eingeschränkt zur Chemotaxis und Phagozytose fähig ist (Ryder 1994). Die Kenntnis der Konzentrationsabhängigkeit lässt verschiedene Mechanismen der Rekrutierung/Infiltration als möglich erscheinen.

Einerseits könnte Nikotin, welches in relativ niedrigen Konzentrationen im Blut zirkuliert, Granulozyten aktiviert haben und diese zu einer Adhäsion und Infiltration von Gewebe angeregt haben. Andererseits könnte es sein, dass die Lunge auf Grund ihrer relativ starken Durchblutung einen großen Teil des Nikotins in ihr Gewebe aufgenommen hat. Die bereits in der Mikrozirkulation der Lunge und im Lungengewebe vorhandenen Granulozyten könnten sich dann auf Grund der hohen Konzentrationen im Gewebe akkumuliert haben, ohne dass eine gesteigerte Rekrutierung/Infiltration von neutrophilen Granulozyten aus der Peripherie stattfand. Eine dritte Möglichkeit ist die Kombination beider Mechanismen. In der Lunge aktivierte und akkumulierte Granulozyten könnten über Botenstoffe wie IL-17 und IL-8 weitere Granulozyten aus der Peripherie rekrutieren (Iho u. a. 2003) und zur Infiltration des Lungengewebes bewegen.

Weiterhin fiel bei der Untersuchung der Lungen von MPO KO Tieren auf, dass es keinen signifikanten Unterschied der Granulozytenanzahl im Gewebe zwischen Nikotin- und Kontrollgruppe gab. Auch gegenüber der Wildtyp Kontrolle zeigte die Nikotin-behandelte KO Maus keine Steigerung der Anzahl von Granulozyten im Lungengewebe. Scheinbar verhinderte die Abwesenheit von MPO eine gesteigerte Akkumulation von Granulozyten im Gewebe. Dies lässt den Schluss zu, dass zumindest die Wirkung des Nikotins auf die Akkumulation/Infiltration MPO abhängig ist.

Es ist bekannt dass Endothelzellen und extrazelluläre Matrixproteine im Ruhezustand einen antiadhäsiven Charakter aufweisen. Ursache dafür sind zum einen Glykosaminoglykane auf der Oberfläche des Endothels die einen Teppich negativer Ladungen ausbilden und sich mit den ebenfalls negativ geladenen Granulozyten abstoßen. Zum anderen werden viele Adhäsionsmoleküle erst nach Aktivierung präsentiert. (Klinke u. a. 2011) konnte *in vitro* zeigen, dass MPO unter Beteiligung von CD 11b die Adhäsion auf inaktivem Endothel steigern kann, sowie eine gerichtete Motilität von Granulozyten induzieren kann. Grund dafür ist scheinbar eine elektrostatische Kraft. Dabei legt sich MPO wie ein Teppich über die negativen Ladungen

der Glykokalix und neutralisiert diese. Gleichzeitig zieht es die negativ geladenen PMNs an. Weiterhin ist bekannt das MPO die Expression des Integrins CD 11b auf der Oberfläche der Granulozyten steigern sowie andere Granulozyten aktivieren kann (Lau u. a. 2005).

4.6 Die Bedeutung von Nikotin für die Endothelfunktion

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass neutrophile Granulozyten in der Lage sind, die Endothelfunktion negativ zu beeinflussen. Dabei stand stets die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und die Sezernierung von MPO im Mittelpunkt der Überlegungen. In klinischen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen hohen MPO Plasmaspiegeln und einem erhöhtem Risiko für die Koronare Herzerkrankung festgestellt werden (R. Zhang u. a. 2001)(Stephan Baldus u. a. 2003). Auch der direkte Zusammenhang zwischen MPO und der Arteriosklerose konnte aufgezeigt werden (Brennan u. a. 2003; Nicholls und Hazen 2005). Weitere Untersuchungen in dieser Richtung deckten einen möglicherweise zugrundeliegenden Mechanismus auf, über den MPO die Konsumption von NO steigert und damit dessen Bioverfügbarkeit deutlich reduziert (S Baldus u. a. 2001; Jason P Eiserich u. a. 2002). Dabei wird die Bioverfügbarkeit für NO im Endothel dermaßen gesenkt, dass nunmehr die konstriktiven Einflussfaktoren überwiegen. Dies bedingt wiederum eine Verschlechterung der Gefäßfunktion und trägt so zur Entstehung der Endotheldysfunktion bei. Außerdem verringern sich durch eine geringere Bioverfügbarkeit von NO dessen antiinflammatorische Effekte, wie sie in der Einleitung beschrieben wurden. Die resultierende Lumenverkleinerung bewirkt außerdem eine Minderung des Blutflusses und der Fließgeschwindigkeit, was wiederum ein Einwandern von Zellen wie den PMNs erleichtert.

Rudolph u. a. konnten im Tierversuch zeigen, dass unabhängig von Nikotin direkt in endarterielle Gefäße applizierte MPO zu einer Flussminderung innerhalb dieser Gefäße und der nachgeschalteten Mikrozirkulation führt. Die selbe Arbeitsgruppe konnte in einer klinischen Studie Nikotin als Initiator dieses Mechanismus identifizieren, ohne dabei den direkten Effekt von Nikotin genauer zu untersuchen (Rudolph u. a. 2011; Jason P Eiserich u. a. 2002).

In unserem Versuchsaufbau machten wir uns diese beiden Erkenntnisse der Arbeitsgruppe zu Nutze, in dem wir zuerst lebende Mäuse mit Nikotin behandelten um eine Aktivierung und MPO-Freisetzung zu provozieren. An den anschließend entnommenen Aorten konnte im Organbad eine deutlich verminderte endothelabhängige Relaxationsfähigkeit gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt auf die Dilatationsfähigkeit des Endothels auf einer durch Nikotin induzierten Freisetzung von MPO beruhte, oder Nikotin durch andere nikotininduzierte Mechanismen Einfluss nahm, wurde der Versuch ebenfalls mit Aorten aus MPO KO Mäusen durchgeführt. Es wurde angenommen, dass durch ein Fehlen von MPO die Verfügbarkeit für NO im Endothel unverändert ist und folglich auch die Funktion der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit erhalten bleibt. Dies bestätigte sich durch eine, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, uneingeschränkte Dilatation. Bei dem Vergleich der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit der beiden Kontrollgruppen (Ctrl WT vs. Ctrl KO) viel auf, dass die erreichten Werte der KO Gruppe bei entsprechender Ach-Konzentration stets hinter denen der WT Gruppe lagen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine unterschiedliche basale eNOS-Expression zwischen den genetischen Tiergruppen sein.

Eine Dysfunktion des Endothels mündet letzten Endes in einer Abnahme von Fluss und Fließgeschwindigkeit. Bereits 1988 konnte (Owasoyo, Jay, und Gillespie 1988) eine durch Nikotin induzierte und durch die PMNs vermittelte Konstriktion der Koronararterien feststellen. Rudolph et al. untersuchten die flussabhängige Relaxation (FMD) am menschlichen Oberarm von MPO-kompetenten und MPO-defizienten Probanden nach Kauen eines Nikotinkaugummi. Während in der Gruppe der MPO-kompetenten eine Verminderung der FMD zu verzeichnen war, zeigte sich bei den MPO-defizienten keinerlei Einschränkung (Rudolph u. a. 2011). Andere Arbeitsgruppen untersuchten ebenfalls den akuten sowie chronischen Einfluss von Nikotin und konnten eine Verschlechterung der Endothelfunktion messen (Celermajer u. a. 1993; Sorensen u. a. 1995; Zeiher, Schächinger, und Minners 1995). Der Versuchsaufbau von Sørensen u. a. ähnelte dabei unseren Versuchen zu Blutfluss und Fließgeschwindigkeit. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine akute Exposition von Rauchern gegenüber Nikotin und Zigarettenrauch zu einer signifikanten Abnahme des Blutflusses in deren Mikrozirkulation führte (Sørensen u. a. 2009). Als Fortführung des Organbadversuchs untersuchten wir die Parameter der Durchblutung *in vivo* in der Mikrozirkulation von

Mäusen, die zuvor über sieben Tage und somit chronisch mit Nikotin behandelt wurden. Alle Nikotin-Tiere zeigten nach Ablauf der Behandlungszeit einen verminderten Fluss und Fließgeschwindigkeit. Einzig die Ergebnisse der MPO KO Tiere zeigten nicht den zu erwartenden Effekt. Die ebenfalls mit Nikotin behandelten MPO KO Mäuse hatten einen ähnlich verminderten Fluss und Fließgeschwindigkeit wie die behandelten Tiere der Wildtyp Population. Diese Ergebnisse können nicht im Kontext mit den vorangehenden Erkenntnissen erklärt werden, da angenommen wird, dass MPO ein wesentlicher Mediator der Gefäßfunktion im Hinblick auf Nikotin ist und die Abwesenheit des Enzyms die Funktion deshalb unbeeinflusst lassen müsste.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass bei einer chronischen Behandlung mit Nikotin andere, MPO unabhängige, oxidative Spezies eine Rolle spielen (Mayhan und Sharpe 1999; Hanna 2006). So ist beispielsweise bekannt, dass Zigarettenrauch die Bildung von Superoxid induzieren kann, welches wiederum in der Lage ist, NO zu Peroxinitrit zu oxidieren und damit zu verbrauchen (Cai und Harrison 2000; Heitzer, Just, und Münzel 1996). Ebenso wird durch Rauchen die Oxidation von Lipoproteinen wie LDL gesteigert (Scheffler u. a. 1992; Harats u. a. 1989) was dazu führen kann, dass sich die eNOS von der Plasmamembran löst (Marsche u. a. 2004) und nichtmehr für die NO-Produktion zu Verfügung steht.

Ebenso kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendete Nikotindosierung im chronischen Behandlungsmodell als zu hoch festgelegt wurde, und so noch unbekannte Nikotin-Effekte in den Vordergrund treten, die unter physiologischen Dosierungen keine Rolle spielen.

4.7 Daraus resultierende Behandlungsmöglichkeiten

4.7.1 Therapeutische Nutzung des nACh-Rezeptors

Um effektive Therapieansätze der Arteriosklerose zu generieren, muss zunächst die exakte Pathogenese der Erkrankung aufgedeckt werden. Im Hinblick auf die Atherogenese und ihre Beeinflussung durch Nikotin, spielt die Interaktion von Nikotin mit dem nACh-Rezeptor eine entscheidende Rolle. Dieser initiale Schritt ist nachweislich für eine Vielfalt der proatherogenen Mechanismen verantwortlich. Eine logische Konsequenz daraus ist eine medikamentöse Blockade der verantwortlichen Rezeptorsubtypen. Viele Arbeitsgruppen konnten unter Verwendung von generellen

Antagonisten, wie etwa Hexamethonium die proatherogenen Effekte von Nikotin in Zellkulturen oder Tiermodellen deutlich reduzieren (Zhen u. a. 2008; Kanda und Watanabe 2007). Auch wir konnten den adhäsionssteigernden Effekt von Nikotin unter Verwendung von Pancuronium deutlich vermindern. Seit der Erforschung des nAChR weiss man um die Existenz diverser Subtypen und ihrer spezifischen Wirkung auch im Bereich der Atherogenese. So konnte beispielsweise durch die Blockade des $\alpha 1$ -nACh-Rezeptors eine signifikante Abnahme von Plaquegröße und Neovaskularisation erreicht werden (J. Lee und Cooke 2011; G. Zhang u. a. 2011). Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass durch eine selektive Blockade des $\alpha 7$ -Rezeptors die Nikotinwirkung auf die Chemotaxis sowie die Migration glatter Muskelzellen deutlich reduziert wurde (Li u. a. 2004). Dabei darf allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass der nACh-Rezeptor ebenso für antiinflammatorische Effekte (siehe Kapitel 4.1), sowie für die Übertragung von Signalen im zentralen Nervensystem und in der Muskulatur verantwortlich ist. Vor der klinischen Verwendung solcher genereller und spezifischer Rezeptorblocker sind zuerst deren Nebenwirkungen in diesen Bereichen zu erforschen.

4.7.2 Modulation einzelner Nikotin-Effekte

Eine weitere Möglichkeit, den proatherogenen Effekt des Nikotins zu hemmen, besteht in der Regulation einzelner Mechanismen. Es ist beispielsweise bekannt, dass Nikotin die Expression von Adhäsionsmolekülen und Transmembranmolekülen wie VCAM und ICAM steigert. Diese Moleküle sind für die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten durch das Endothel verantwortlich (O'Brien u. a. 1996). Cirillo u.a. konnten in Versuchen mit humanen Koronarendothelzellen (HCAECs) zeigen, dass lipophile HMGCo-Reduktasehemmer wie Simvastatin, die Expressionssteigerung der CAM-Proteine signifikant reduzieren, indem sie die Signaltransduktionswege von RhoA und NF- κ B hemmen (Cirillo u. a. 2007). Statine finden bekanntermaßen bereits Verwendung in der Therapie bzw. Vorsorge der koronaren Herzerkrankung.

4.7.3 MPO-Liberation

Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und die daraufhin folgende Freisetzung von Myeloperoxidase ist ein weiterer zentraler Mechanismus der proatherogenen Wirkung von Nikotin. Das freigesetzte MPO ist wesentlich an der Entstehung der

endothelialen Dysfunktion und weitere proatherogenen Vorgängen beteiligt. MPO bindet nach der Freisetzung innerhalb des Gefäßlumens an Heparansulfat-Glucosaminoglycane (GAG) auf der Oberfläche der Endothelzellen (Daphna u. a. 1998) (Buffon u. a. 2002; Lau und Baldus 2006), wo es aufgrund seiner katalytischen Eigenschaften die Bioverfügbarkeit von NO innerhalb der Gefäßwand reduziert und dadurch die Endothelfunktion herabsetzt. Rudolph u.a. konnten zeigen, dass unfraktioniertes Heparin nicht nur das endothelgebundene MPO löst, sondern dass dadurch auch die Endothelfunktion verbessert wird (Stephan Baldus u. a. 2006; Rudolph u. a. 2010).

5 Zusammenfassung

Rauchen und das dadurch aufgenommene Nikotin verursachen eine Vielzahl von Erkrankungen, unter anderem auch Herz-Kreislaufkrankungen wie die Arteriosklerose, eine chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäßwand.

Heutzutage geht man davon aus, dass eine Dysfunktion des Endothels für die Entstehung der Arteriosklerose verantwortlich ist. Ein wesentliches Merkmal dieser Dysfunktion ist dabei das mangelhafte Angebot an Stickstoffmonoxid (NO) innerhalb der Gefäßwand. Neuere Studien zu diesem Thema konnten zeigen, dass neutrophile Granulozyten mit Hilfe des Enzyms Myeloperoxidase, wesentlich Einfluss auf die Verfügbarkeit von NO innerhalb der Gefäßwand nehmen. Myeloperoxidase ist ein Häm-Protein, das bei der Aktivierung der Zellen ausgeschüttet wird. Durch die katalytischen Fähigkeiten ist Myeloperoxidase nachweislich für diverse proinflammatorische und damit proarteriosklerotische Wirkungen der neutrophilen Granulozyten verantwortlich. So führen MPO-generierte reaktive Spezies unter anderem zu einer Oxidation von Lipoproteinen, zur Veränderung der Funktionen von Strukturproteinen durch Nitrierung sowie zur Reduktion der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid innerhalb der Gefäßwand.

Diese Arbeit beschreibt in mehreren Schritten den Zusammenhang zwischen einer nikotininduzierten Aktivierung neutrophiler Granulozyten *in vitro*, einer darauf folgenden MPO-Freisetzung und schließlich der daraus resultierenden Dysfunktion des Endothels. Nikotin führte zur gesteigerten Infiltration, Adhäsion und Degranulation der neutrophilen Granulozyten *in vitro* und pulmonal in einem Mausmodell nach systemischer Nikotin-Applikation. In weiterführenden Untersuchungen konnte eine nikotininduzierte und MPO-abhängige Abnahme der endothelialen Funktion beobachtet werden. Darüber hinaus festigen unsere Ergebnisse die Hypothese, wonach Myeloperoxidase ein zentrales Element der Manifestation einer endothelialen Dysfunktion darstellt und zeigen einen zusätzlichen Mechanismus, mit dem Nikotin (vaskulär) proinflammatorisch und damit potentiell proatherogen wirkt.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ATP	Adenosintriphosphat
Br ⁻	Bromidion
BSA	Bovines Serumalbumin
Cl ⁻	Chloridion
CNP	Natriuretisches Peptid C
CO ₂	Kohlendioxid
Ctrl	Kontrolle
CYP	Cytochrom P
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Fe	Eisen
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
FN	Fibronektin
GAG	(Heparansulfat)Glykosaminoglykan
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HCAEC	Humane Koronarendothelzellen
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase

HOCL	Hypochlorid
I ⁻	Iodidion
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knock Out
LDL	Low Density Lipoprotein
Ly-6G	Lymphozytenantigen 6G
MCP-1	Monozyten-Chemokin-1
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
MPO-I	Myeloperoxidase-Compound I
MPO-II	Myeloperoxidase-Compound II
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
nAChR	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
Nic	Nikotin
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ [•]	Stickstoffdioxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₂ Tyr	Nitrotyrosin
NTG	Nitroglycerin
O ₂ ⁻	Superoxidanion
ONOO ⁻	Peroxinitrit

PBS	Phosphat Buffered Saline
PGF ₂	Prostaglandin F ₂
PGI ₂	Prostazyklin
PMN	Neutrophiler Granulozyt Engl. polymorphonuclear neutrophil
R [•]	Radikales Zwischenprodukt
RH	Substrat der Myeloperoxidase
SEM	Standardfehler
SLURP-1	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1
sO ₂	Sauerstoffsättigung
SOD	Superoxiddismutase
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TschG	
Tyr	Tyrosin
Tyr [•]	Tyrosinradikal
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzelle
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

- Abu-Soud, H M, und S L Hazen. 2000a. „Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase“. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (8) (Februar 25): 5425–5430.
- . 2000b. „Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases“. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (48) (Dezember 1): 37524–37532.
- Aicher, Alexandra, Christopher Heeschen, Mariette Mohaupt, John P Cooke, Andreas M Zeiher, und Stefanie Dimmeler. 2003. „Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions“. *Circulation* 107 (4) (Februar 4): 604–611.
- Akin, D T, und J M Kinkade Jr. 1986. „Processing of a newly identified intermediate of human myeloperoxidase in isolated granules occurs at neutral pH“. *The Journal of Biological Chemistry* 261 (18) (Juni 25): 8370–8375.
- Albaugh, Gregory, Emily Bellavance, Louise Strande, Stacy Heinburger, Charles W Hewitt, und James B Alexander. 2004. „Nicotine induces mononuclear leukocyte adhesion and expression of adhesion molecules, VCAM and ICAM, in endothelial cells in vitro“. *Annals of vascular surgery* 18 (3) (Mai): 302–307. doi:10.1007/s10016-004-0030-9.
- Anderson, S I, N A Hotchin, und G B Nash. 2000. „Role of the cytoskeleton in rapid activation of CD11b/CD18 function and its subsequent downregulation in neutrophils“. *Journal of Cell Science* 113 (Pt 15) (August): 2737–2745.
- Arredondo, Juan, Alexander I Chernyavsky, David L Jolkovsky, Robert J Webber, und Sergei A Grando. 2006. „SLURP-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium“. *Journal of cellular physiology* 208 (1) (Juli): 238–245. doi:10.1002/jcp.20661.
- Arredondo, Juan, Alexander I Chernyavsky, Robert J Webber, und Sergei A Grando. 2005. „Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes“. *The Journal of investigative dermatology* 125 (6) (Dezember): 1236–1241. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23973.x.
- Ashakumary, L, und P L Vijayammal. 1997. „Effect of nicotine on lipoprotein metabolism in rats“. *Lipids* 32 (3) (März): 311–315.
- Baldus, S, J P Eiserich, A Mani, L Castro, M Figueroa, P Chumley, W Ma, u. a. 2001. „Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration“. *The Journal of Clinical Investigation* 108 (12) (Dezember): 1759–1770. doi:10.1172/JCI12617.
- Baldus, Stephan, Jason P Eiserich, Marie-Luise Brennan, Robert M Jackson, C Bruce Alexander, und Bruce A Freeman. 2002. „Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases“. *Free Radical Biology & Medicine* 33 (7) (Oktober 1): 1010.
- Baldus, Stephan, Christopher Heeschen, Thomas Meinertz, Andreas M. Zeiher, Jason P. Eiserich, Thomas Münzel, Maarten L. Simoons, Christian W. Hamm, und on behalf of the CAPTURE Investigators. 2003. „Myeloperoxidase Serum Levels Predict Risk in Patients With Acute Coronary Syndromes“. *Circulation* 108 (12): 1440–1445. doi:10.1161/01.CIR.0000090690.67322.51.
- Baldus, Stephan, Volker Rudolph, Mika Roiss, Wulf D Ito, Tanja K Rudolph, Jason P Eiserich, Karsten Sydow, u. a. 2006. „Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase“. *Circulation* 113 (15) (April 18): 1871–1878. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.590083.
- Benhammou, K, M Lee, M Strook, B Sullivan, J Logel, K Raschen, C Gotti, und S

- Leonard. 2000. „[(3)H]Nicotine binding in peripheral blood cells of smokers is correlated with the number of cigarettes smoked per day“. *Neuropharmacology* 39 (13) (Oktober): 2818–2829.
- Benowitz, Neal L, Christina N Lessov-Schlaggar, Gary E Swan, und Peyton Jacob 3rd. 2006. „Female sex and oral contraceptive use accelerate nicotine metabolism“. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 79 (5) (Mai): 480–488. doi:10.1016/j.clpt.2006.01.008.
- Benowitz, NL, H Porchet, und P 3rd Jacob. 1990. „Pharmacokinetics, metabolism, and pharmacodynamics of nicotine.“ In *Wonnacott S, Russell MAH, Stolerman IP (eds): Nicotine psychopharmacology*, 112–157. Oxford: Oxford University Press.
- Birkedal-Hansen, H, W G Moore, M K Bodden, L J Windsor, B Birkedal-Hansen, A DeCarlo, und J A Engler. 1993. „Matrix metalloproteinases: a review“. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 4 (2): 197–250.
- Blackhurst, JD. 1966. „Further work on ‚extractable‘ nicotine“.
- Blann, A D, C Steele, und C N McCollum. 1997. „The influence of smoking on soluble adhesion molecules and endothelial cell markers“. *Thrombosis Research* 85 (5) (März 1): 433–438.
- Bloemen, P G, P A Henricks, und F P Nijkamp. 1997. „Cell adhesion molecules and asthma“. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 27 (2) (Februar): 128–141.
- Booyse, F M, G Osikowicz, und A J Quarfoot. 1981. „Effects of chronic oral consumption of nicotine on the rabbit aortic endothelium“. *The American journal of pathology* 102 (2) (Februar): 229–238.
- Borgerding, Michael, und Hubert Klus. 2005. „Analysis of complex mixtures--cigarette smoke“. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Für Toxikologische Pathologie* 57 Suppl 1 (Juli): 43–73.
- Brennan, Marie-Luise, Marc S Penn, Frederick Van Lente, Vijay Nambi, Mehdi H Shishehbor, Ronnier J Aviles, Marlene Goormastic, u. a. 2003. „Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain“. *The New England Journal of Medicine* 349 (17) (Oktober 23): 1595–1604. doi:10.1056/NEJMoa035003.
- Bridges, R B, J H Kraal, L J Huang, und M B Chancellor. 1977. „Effects of cigarette smoke components on in vitro chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes“. *Infection and Immunity* 16 (1) (April): 240–248.
- Brown, K E, E M Brunt, und J W Heinecke. 2001. „Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver“. *The American Journal of Pathology* 159 (6) (Dezember): 2081–2088. doi:10.1016/S0002-9440(10)63059-3.
- Buffon, Antonino, Luigi M Biasucci, Giovanna Liuzzo, Giuseppe D’Onofrio, Filippo Crea, und Attilio Maseri. 2002. „Widespread coronary inflammation in unstable angina“. *The New England Journal of Medicine* 347 (1) (Juli 4): 5–12. doi:10.1056/NEJMoa012295.
- Cai, H, und D G Harrison. 2000. „Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress“. *Circulation Research* 87 (10) (November 10): 840–844.
- Celermajer, D S, K E Sorensen, D Georgakopoulos, C Bull, O Thomas, J Robinson, und J E Deanfield. 1993. „Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults“. *Circulation* 88 (5 Pt 1) (November): 2149–2155.
- Changeux, JP. „The acetylcholin receptor: a model for allosteric membrane proteins“. *Biochem Soc Trans* (23). Tudichum medal lecture: 195–205.
- Chattopadhyay, K, und B D Chattopadhyay. 2008. „Effect of nicotine on lipid profile,

- peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein“. *The Indian journal of medical research* 127 (6) (Juni): 571–576.
- Choi, Eun Young, Sentot Santoso, und Triantafyllos Chavakis. 2009. „Mechanisms of neutrophil transendothelial migration“. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 14: 1596–1605.
- Cirillo, Plinio, Mario Pacileo, Salvatore De Rosa, Paolo Calabrò, Annarita Gargiulo, Valeria Angri, Nella Prevete, u. a. 2007. „HMG-CoA reductase inhibitors reduce nicotine-induced expression of cellular adhesion molecules in cultured human coronary endothelial cells“. *Journal of Vascular Research* 44 (6): 460–470. doi:10.1159/000106464.
- Conti-Tronconi, B M, K E McLane, M A Raftery, S A Grando, und M P Protti. 1994. „The nicotinic acetylcholine receptor: structure and autoimmune pathology“. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 29 (2): 69–123. doi:10.3109/10409239409086798.
- Cooke, John P. 2007. „Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor“. *Life sciences* 80 (24-25) (Mai 30): 2347–2351. doi:10.1016/j.lfs.2007.01.061.
- Cooke, John P, und Haim Bitterman. 2004. „Nicotine and angiogenesis: a new paradigm for tobacco-related diseases“. *Annals of medicine* 36 (1): 33–40.
- Cooke, John P, und Yohannes T Ghebremariam. 2008. „Endothelial nicotinic acetylcholine receptors and angiogenesis“. *Trends in cardiovascular medicine* 18 (7) (Oktober): 247–253. doi:10.1016/j.tcm.2008.11.007.
- Corberand, J, P Laharrague, F Nguyen, G Dutau, M Fontanilles, B Gleizes, und E Gyrard. 1980. „In vitro effect of tobacco smoke components on the functions of normal human polymorphonuclear leukocytes“. *Infection and Immunity* 30 (3) (Dezember): 649–655.
- Craig, W Y, G E Palomaki, und J E Haddow. 1989. „Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data“. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 298 (6676) (März 25): 784–788.
- Cucina, A, P Sapienza, V Corvino, V Borrelli, V Mariani, B Randone, L Santoro D’Angelo, und A Cavallaro. 2000. „Nicotine-induced smooth muscle cell proliferation is mediated through bFGF and TGF-beta 1“. *Surgery* 127 (3) (März): 316–322.
- Cucina, A, P Sapienza, V Corvino, V Borrelli, B Randone, L Santoro-D’Angelo, und A Cavallaro. 2000. „Nicotine induces platelet-derived growth factor release and cytoskeletal alteration in aortic smooth muscle cells“. *Surgery* 127 (1) (Januar): 72–78. doi:10.1067/msy.2000.102422.
- Daphna, E M, S Michaela, P Eynat, A Irit, und S Rimon. 1998. „Association of myeloperoxidase with heparin: oxidative inactivation of proteins on the surface of endothelial cells by the bound enzyme“. *Molecular and Cellular Biochemistry* 183 (1-2) (Juni): 55–61.
- Deby-Dupont, G, S Grülke, I Caudron, M Mathy-Hartert, H Benbarek, C Deby, M Lamy, und D Serteyn. 1998. „Equine neutrophil myeloperoxidase in plasma: design of a radio-immunoassay and first results in septic pathologies“. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 66 (3-4) (Dezember 11): 257–271.
- Desjardins, F, und J L Balligand. 2006. „Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease“. *Acta Clinica Belgica* 61 (6) (Dezember): 326–334.
- Di Luozzo, Gabriele, Sanjeev Pradhan, Ajay K Dhadwal, Alan Chen, Hirokazu Ueno, und Bauer E Sumpio. 2005. „Nicotine induces mitogen-activated protein kinase dependent vascular smooth muscle cell migration“. *Atherosclerosis* 178 (2) (Februar): 271–277. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.09.017.

- Doull, J, JP Fraw, W George, TA Loomis, RA Squire, and S Taylor. 1994. „List of ingredients added to tobacco in the manufacture of cigarettes by six major American cigarette companies“. *Tob J Int*.
- Doyle, Brendan, and Noel Caplice. 2007. „Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis“. *Journal of the American College of Cardiology* 49 (21) (Mai 29): 2073–2080. doi:10.1016/j.jacc.2007.01.089.
- Eiserich, J P, M Hristova, C E Cross, A D Jones, B A Freeman, B Halliwell, and A van der Vliet. 1998. „Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils“. *Nature* 391 (6665) (Januar 22): 393–397. doi:10.1038/34923.
- Eiserich, Jason P, Stephan Baldus, Marie-Luise Brennan, Wenxin Ma, Chunxiang Zhang, Albert Tousson, Laura Castro, u. a. 2002. „Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase“. *Science (New York, N.Y.)* 296 (5577) (Juni 28): 2391–2394. doi:10.1126/science.1106830.
- Everse, J. 1998. „The structure of heme proteins Compounds I and II: some misconceptions“. *Free Radical Biology & Medicine* 24 (7-8) (Mai): 1338–1346.
- Exner, Markus, Marcela Hermann, Roland Hofbauer, Beda Hartmann, Stylianos Kapiotis, und Bernhard Gmeiner. 2004. „Thiocyanate catalyzes myeloperoxidase-initiated lipid oxidation in LDL“. *Free Radical Biology & Medicine* 37 (2) (Juli 15): 146–155. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.039.
- Fenna, R, J Zeng, und C Davey. 1995. „Structure of the green heme in myeloperoxidase“. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316 (1) (Januar 10): 653–656. doi:10.1006/abbi.1995.1086.
- Feyerabend, C, T Higenbottam, und M A Russell. 1982. „Nicotine concentrations in urine and saliva of smokers and non-smokers“. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* 284 (6321) (April 3): 1002–1004.
- Fliss, H. 1988. „Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants“. *Molecular and Cellular Biochemistry* 84 (2) (Dezember): 177–188.
- Foo, L C, I Roshidah, und M B Aimy. 1991. „Platelets of habitual smokers have reduced susceptibility to aggregating agent“. *Thrombosis and Haemostasis* 65 (3) (März 4): 317–319.
- Freedman, D S, W D Flanders, J J Barboriak, A M Malarcher, und L Gates. 1996. „Cigarette smoking and leukocyte subpopulations in men“. *Annals of Epidemiology* 6 (4) (Juli): 299–306.
- Fu, X, S Y Kassim, W C Parks, und J W Heinecke. 2001. „Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase“. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (44) (November 2): 41279–41287. doi:10.1074/jbc.M106958200.
- George, S J. 2000. „Therapeutic potential of matrix metalloproteinase inhibitors in atherosclerosis“. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9 (5) (Mai): 993–1007. doi:10.1517/13543784.9.5.993.
- Gillespie, M N, J O Owasoyo, S Kojima, und M Jay. 1987. „Enhanced chemotaxis and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes from nicotine-treated and smoke-exposed rats“. *Toxicology* 45 (1) (Juli): 45–52.
- Green, DR, und A Rodgman. 1996. „The Tobacco Chemists’ Research Conference. A half-century of advances in analytical methodology of tobacco and its products“. *Rec Adv Tob Sci* 22: 131–304.
- Green, Pattie S, Armando J Mendez, Jason S Jacob, Jan R Crowley, Whit Growdon, Bradley T Hyman, und Jay W Heinecke. 2004. „Neuronal expression of

- myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease". *Journal of Neurochemistry* 90 (3) (August): 724–733. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02527.x.
- Gries, A, C Bode, K Peter, A Herr, H Böhrer, J Motsch, und E Martin. 1998. „Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo“. *Circulation* 97 (15) (April 21): 1481–1487.
- Groneberg, David, und Knut-Olaf Hausteil. 2008. „Kapitel 4: Pharmakologie von Nikotin“. In *Tabakabhängigkeit: Gesundheitliche Schäden durch das Rauchen*, Auflage: 2., neu bearb. u. erw. Aufl. (11. Februar 2008):77–102. Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Grundtman, Cecilia, und Georg Wick. 2011. „The autoimmune concept of atherosclerosis“. *Current opinion in lipidology* 22 (5) (Oktober): 327–334. doi:10.1097/MOL.0b013e32834aa0c2.
- Hanna, Salma Toma. 2006. „Nicotine Effect on Cardiovascular System and Ion Channels“. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 47 (3) (März): 348–358. doi:10.1097/01.fjc.0000205984.13395.9e.
- Harats, D, M Ben-Naim, Y Dabach, G Hollander, O Stein, und Y Stein. 1989. „Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages“. *Atherosclerosis* 79 (2-3) (Oktober): 245–252.
- Hausteil, Kurt Olaf, und David Groneberg. 2008. *Tabakabhängigkeit: Gesundheitliche Schäden durch das Rauchen 2.Auflage*. Bd. 2, neu bearb. u. erw. Aufl. (11. Februar 2008). Kapitel 3: Tabak, Tabakinhalts- und -zusatzstoffe: Springer Berlin Heidelberg;
- Hazen, S L, R Zhang, Z Shen, W Wu, E A Podrez, J C MacPherson, D Schmitt, u. a. 1999. „Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo“. *Circulation Research* 85 (10) (November 12): 950–958.
- Heeschen, Christopher, Michael Weis, und John P Cooke. 2003. „Nicotine promotes arteriogenesis“. *Journal of the American College of Cardiology* 41 (3) (Februar 5): 489–496.
- Heitzer, T, H Just, und T Münzel. 1996. „Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers“. *Circulation* 94 (1) (Juli 1): 6–9.
- Henningfield, J E, und R M Keenan. 1993. „Nicotine delivery kinetics and abuse liability“. *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 61 (5) (Oktober): 743–750.
- Henningfield, J E, J M Stapleton, N L Benowitz, R F Grayson, und E D London. 1993. „Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking“. *Drug and Alcohol Dependence* 33 (1) (Juni): 23–29.
- Hiebert, L M, und L B Jaques. 1976. „The observation of heparin on endothelium after injection“. *Thrombosis Research* 8 (2) (Februar): 195–204.
- Hoffmann, D, und I Hoffmann. 1997. „The changing cigarette, 1950-1995“. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 50 (4) (März): 307–364. doi:10.1080/009841097160393.
- Hosur, Vishnu, Scott Leppanen, Adham Abutaha, und Ralph H Loring. 2009. „Gene regulation of alpha4beta2 nicotinic receptors: microarray analysis of nicotine-induced receptor up-regulation and anti-inflammatory effects“. *Journal of Neurochemistry* 111 (3) (November): 848–858. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06373.x.
- Hu, Cui-Zhu, Yan-Li Cao, Hai-Yang Huo, Wei-Hua Zhao, und Jian Hu. 2009. „Inhibitory effect of ghrelin on nicotine-induced VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells“. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 53 (3)

- (März): 241–245. doi:10.1097/FJC.0b013e31819c74dc.
- Hukkanen, Janne, Peyton Jacob 3rd, und Neal L Benowitz. 2005a. „Metabolism and disposition kinetics of nicotine“. *Pharmacological Reviews* 57 (1) (März): 79–115. doi:10.1124/pr.57.1.3.
- Hukkanen, Janne, Pleyton Jacob, und Neal L. Benowitz. 2005b. „Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine“. *Pharmacological Reviews* 57 (1) (März 1): 79 – 115. doi:10.1124/pr.57.1.3.
- Huston, Jared M, Mauricio Rosas-Ballina, Xiangying Xue, Oonagh Dowling, Kanta Ochani, Mahendar Ochani, Michael M Yeboah, Prodyot K Chatterjee, Kevin J Tracey, und Christine N Metz. 2009. „Cholinergic neural signals to the spleen down-regulate leukocyte trafficking via CD11b“. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (1) (Juli 1): 552–559. doi:10.4049/jimmunol.0802684.
- Ignarro, L J, J N Degnan, W H Baricos, P J Kadowitz, und M S Wolin. 1982. „Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung“. *Biochimica Et Biophysica Acta* 718 (1) (September 17): 49–59.
- Iho, Sumiko, Yukie Tanaka, Rumiko Takauji, Chino Kobayashi, Ikunobu Muramatsu, Hiromichi Iwasaki, Kishiko Nakamura, Yutaka Sasaki, Kazuwa Nakao, und Takayuki Takahashi. 2003. „Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF- κ B“. *Journal of Leukocyte Biology* 74 (5) (November 1): 942 –951. doi:10.1189/jlb.1202626.
- Ischiropoulos, H. 1998. „Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species“. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 356 (1) (August 1): 1–11. doi:10.1006/abbi.1998.0755.
- Jacob, P, 3rd, M Wilson, und N L Benowitz. 1981. „Improved gas chromatographic method for the determination of nicotine and cotinine in biologic fluids“. *Journal of Chromatography* 222 (1) (Januar 2): 61–70.
- Jacob, T, N Clouden, A Hingorani, und E Ascher. 2009. „The effect of cotinine on telomerase activity in human vascular smooth muscle cells“. *The Journal of cardiovascular surgery* 50 (3) (Juni): 345–349.
- Janoff, A, L Raju, und R Dearing. 1983. „Levels of elastase activity in bronchoalveolar lavage fluids of healthy smokers and nonsmokers“. *The American Review of Respiratory Disease* 127 (5) (Mai): 540–544.
- Kalra, V K, Y Ying, K Deemer, R Natarajan, J L Nadler, und T D Coates. 1994. „Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells“. *Journal of Cellular Physiology* 160 (1) (Juli): 154–162. doi:10.1002/jcp.1041600118.
- Kanda, Yasunari, und Yasuhiro Watanabe. 2007. „Nicotine-induced vascular endothelial growth factor release via the EGFR-ERK pathway in rat vascular smooth muscle cells“. *Life sciences* 80 (15) (März 20): 1409–1414. doi:10.1016/j.lfs.2006.12.033.
- Karlin, A. 1993. „Structure of nicotinic acetylcholine receptors“. *Current Opinion in Neurobiology* 3 (3) (Juni): 299–309.
- Kettle, A J, C J van Dalen, und C C Winterbourn. 1997. „Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration“. *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 3 (5-6) (Dezember): 257–258.
- Klinke, Anna, Claudia Nussbaum, Lukas Kubala, Kai Friedrichs, Tanja K Rudolph, Volker Rudolph, Hans-Joachim Paust, u. a. 2011. „Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces“. *Blood* 117 (4) (Januar 27): 1350–1358.

- doi:10.1182/blood-2010-05-284513.
- Klut, M E, C M Doerschuk, S F Van Eeden, A R Burns, and J C Hogg. 1993. „Activation of neutrophils within pulmonary microvessels of rabbits exposed to cigarette smoke“. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 9 (1) (Juli): 82–89.
- Koeffler, H P, J Ranyard, and M Pertcheck. 1985. „Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation“. *Blood* 65 (2) (Februar): 484–491.
- Kubes, P, M Suzuki, and D N Granger. 1991. „Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (11) (Juni 1): 4651–4655.
- Lanza, F. 1998. „Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency“. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 76 (10) (September): 676–681.
- Lau, Denise, und Stephan Baldus. 2006. „Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease“. *Pharmacology & Therapeutics* 111 (1) (Juli): 16–26. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.06.023.
- Lau, Denise, Hanke Mollnau, Jason P. Eiserich, Bruce A. Freeman, Andreas Daiber, Ursula M. Gehling, Jens Brümmer, u. a. 2005. „Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2) (Januar 11): 431–436. doi:10.1073/pnas.0405193102.
- Lavi, Shahar, Abhiram Prasad, Eric H Yang, Verghese Mathew, Robert D Simari, Charanjit S Rihal, Lilach O Lerman, und Amir Lerman. 2007. „Smoking is associated with epicardial coronary endothelial dysfunction and elevated white blood cell count in patients with chest pain and early coronary artery disease“. *Circulation* 115 (20) (Mai 22): 2621–2627. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.641654.
- Lee, Jieun, und John P Cooke. 2011. „The role of nicotine in the pathogenesis of atherosclerosis“. *Atherosclerosis* 215 (2) (April): 281–283. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.003.
- Lee, Sang Koo, Choung Soo Kim, Won Seok Yang, Soon Bae Kim, Su-Kil Park, und Jung Sik Park. 2002. „Exogenous nitric oxide inhibits tumor necrosis factor-alpha- or interleukin-1-beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mesangial cells. Role of IkappaB-alpha and cyclic GMP“. *Nephron* 92 (4) (Dezember): 780–787.
- Leeuwenburgh, C, M M Hardy, S L Hazen, P Wagner, S Oh-ishi, U P Steinbrecher, und J W Heinecke. 1997. „Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima“. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (3) (Januar 17): 1433–1436.
- Leeuwenburgh, C, J E Rasmussen, F F Hsu, D M Mueller, S Pennathur, und J W Heinecke. 1997. „Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques“. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (6) (Februar 7): 3520–3526.
- Leonard, S, und D Bertrand. 2001. „Neuronal nicotinic receptors: from structure to function“. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 3 (3) (August): 203–223. doi:10.1080/14622200110050213.
- Li, Sheng, Tiejun Zhao, Hong Xin, Li-Hong Ye, Xiaodong Zhang, Hideyuki Tanaka, Akio Nakamura, und Kazuhiro Kohama. 2004. „Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit mediates migration of vascular smooth muscle cells toward nicotine“. *Journal of pharmacological sciences* 94 (3) (März): 334–338.

- Libby, P. 2000. „Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization“. *The American Journal of Cardiology* 86 (8B) (Oktober 19): 3J–8J; discussion 8J–9J.
- Libby, Peter. 2002. „Inflammation in atherosclerosis“. *Nature* 420 (6917) (Dezember 19): 868–874. doi:10.1038/nature01323.
- Ludwig, P W, und J R Hoidal. 1982. „Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers“. *The American Review of Respiratory Disease* 126 (6) (Dezember): 977–980.
- MacDermott, A B, L W Role, und S A Siegelbaum. 1999. „Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release“. *Annual Review of Neuroscience* 22: 443–485. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.443.
- MacNee, W, B Wiggs, A S Belzberg, und J C Hogg. 1989. „The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs“. *The New England Journal of Medicine* 321 (14) (Oktober 5): 924–928. doi:10.1056/NEJM198910053211402.
- Malle, E, G Waeg, R Schreiber, E F Gröne, W Sattler, und H J Gröne. 2000. „Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins“. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 267 (14) (Juli): 4495–4503.
- Marasini, B, M L Biondi, S Barbesti, G Zatta, und A Agostoni. 1986. „Cigarette smoking and platelet function“. *Thrombosis Research* 44 (1) (Oktober 1): 85–94.
- Marsche, Gunther, Regine Heller, Günter Fauler, Alenka Kovacevic, Alexander Nuszowski, Wolfgang Graier, Wolfgang Sattler, und Ernst Malle. 2004. „2-chlorohexadecanal derived from hypochlorite-modified high-density lipoprotein-associated plasminogen is a natural inhibitor of endothelial nitric oxide biosynthesis“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (12) (Dezember): 2302–2306. doi:10.1161/01.ATV.0000148703.43429.25.
- Matta, Shannon G, David J Balfour, Neal L Benowitz, R Thomas Boyd, Jerry J Buccafusco, Anthony R Caggiula, Caroline R Craig, u. a. 2007. „Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research“. *Psychopharmacology* 190 (3) (Februar): 269–319. doi:10.1007/s00213-006-0441-0.
- Mayhan, W G, und G M Sharpe. 1999. „Chronic Exposure to Nicotine Alters Endothelium-dependent Arteriolar Dilatation: Effect of Superoxide Dismutase“. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 86 (4) (April): 1126–1134.
- McGehee, D S, und L W Role. 1995. „Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons“. *Annual Review of Physiology* 57: 521–546. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.002513.
- Molander, L, A Hansson, und E Lunell. 2001. „Pharmacokinetics of nicotine in healthy elderly people“. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 69 (1) (Januar): 57–65. doi:10.1067/mcp.2001.113181.
- Muller, Gregor, und Henning Morawietz. 2009. „Nitric Oxide, NAD(P)H Oxidase, and Atherosclerosis“. *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (7) (Juli): 1711–1731. doi:10.1089/ARS.2008.2403.
- Muller, W A. 2013. „Getting Leukocytes to the Site of Inflammation“. *Veterinary Pathology* 50 (1) (Januar): 7–22. doi:10.1177/0300985812469883.
- Nicholls, Stephen J, und Stanley L Hazen. 2005. „Myeloperoxidase and cardiovascular disease“. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (6) (Juni): 1102–1111. doi:10.1161/01.ATV.0000163262.83456.6d.
- Nowak, D, U Ruta, und G Piasecka. 1990. „Nicotine increases human polymorphonuclear leukocytes chemotactic response--a possible additional mechanism of lung injury in cigarette smokers“. *Experimental Pathology* 39 (1):

- 37–43.
- Overbeek, Saskia A, Saskia Braber, Paul A J Henricks, Marije Kleinjan, Vera M Kamp, Niki A Georgiou, Johan Garssen, Aletta D Kraneveld, und Gert Folkerts. 2011. „Cigarette smoke induces β 2-integrin-dependent neutrophil migration across human endothelium“. *Respiratory Research* 12: 75. doi:10.1186/1465-9921-12-75.
- Owasoyo, J O, M Jay, und M N Gillespie. 1988. „Impact of nicotine on myocardial neutrophil uptake“. *Toxicology and Applied Pharmacology* 92 (1) (Januar): 86–94.
- Parry, H, S Cohen, J E Schlarb, D A Tyrrell, A Fisher, M A Russell, und M J Jarvis. 1997. „Smoking, alcohol consumption, and leukocyte counts“. *American Journal of Clinical Pathology* 107 (1) (Januar): 64–67.
- Parthasarathy, S. 1999. „Oxidants and antioxidants in atherogenesis“. *J Lipid Res* (40). An appraisal: 2143–55.
- Radomski, M W, R M Palmer, und S Moncada. 1987. „Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium“. *Lancet* 2 (8567) (November 7): 1057–1058.
- Ross, R. 1999. „Atherosclerosis--an inflammatory disease“. *The New England Journal of Medicine* 340 (2) (Januar 14): 115–126. doi:10.1056/NEJM199901143400207.
- Rudolph, Tanja K, Volker Rudolph, und Stephan Baldus. 2008. „Contribution of myeloperoxidase to smoking-dependent vascular inflammation“. *Proceedings of the American Thoracic Society* 5 (8) (Dezember 1): 820–823. doi:10.1513/pats.200807-063TH.
- Rudolph, Tanja K, Volker Rudolph, Anna Witte, Anna Klinke, Katalin Szoecs, Denise Lau, Thomas Heitzer, Thomas Meinertz, und Stephan Baldus. 2010. „Liberation of vessel adherent myeloperoxidase by enoxaparin improves endothelial function“. *International journal of cardiology* 140 (1) (April 1): 42–47. doi:10.1016/j.ijcard.2008.10.035.
- Rudolph, Tanja K, Sabine Wipper, Beate Reiter, Volker Rudolph, Anja Coym, Christian Detter, Denise Lau, u. a. 2011. „Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans“. *European Heart Journal* (Juni 30). doi:10.1093/eurheartj/ehr193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724624>.
- Russell, M A, C Feyerabend, und P V Cole. 1976. „Plasma nicotine levels after cigarette smoking and chewing nicotine gum“. *British Medical Journal* 1 (6017) (Mai 1): 1043–1046.
- Ryder, M I. 1994. „Nicotine effects on neutrophil F-actin formation and calcium release: implications for tobacco use and pulmonary diseases“. *Experimental Lung Research* 20 (4) (August): 283–296.
- Saeed, Rubina W, Santosh Varma, Tina Peng-Nemeroff, Barbara Sherry, David Balakhaneh, Jared Huston, Kevin J Tracey, Yousef Al-Abed, und Christine N Metz. 2005. „Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation“. *The Journal of Experimental Medicine* 201 (7) (April 4): 1113–1123. doi:10.1084/jem.20040463.
- Santanam, Nalini, Brent A Thornhill, Jamie K Lau, Clayton M Crabtree, Carla R Cook, Kathleen C Brown, und Piyali Dasgupta. 2012. „Nicotinic acetylcholine receptor signaling in atherogenesis“. *Atherosclerosis* 225 (2) (Dezember): 264–273. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.041.
- Schedel, Angelika, Sophia Thornton, Patrick Schloss, Harald Klüter, und Peter Bugert. 2011. „Human platelets express functional α 7-nicotinic acetylcholine receptors“. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31 (4) (April): 928–934. doi:10.1161/ATVBAHA.110.218297.
- Scheffler, E, E Wiest, J Woehrle, I Otto, I Schulz, L Huber, R Ziegler, und H A Dresel. 1992. „Smoking influences the atherogenic potential of low-density lipoprotein“.

- The Clinical Investigator* 70 (3-4) (April): 263–268.
- Schmitt, D, Z Shen, R Zhang, S M Colles, W Wu, R G Salomon, Y Chen, G M Chisolm, und S L Hazen. 1999. „Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum“. *Biochemistry* 38 (51) (Dezember 21): 16904–16915.
- Schneider, N G, R E Olmstead, M A Franzon, und E Lunell. 2001. „The nicotine inhaler: clinical pharmacokinetics and comparison with other nicotine treatments“. *Clinical Pharmacokinetics* 40 (9): 661–684.
- Schulze, Alexander, und Thomas Lampert. 2006. „Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes Bundes-Gesundheitssurvey: Soziale Unterschiede im Rauchverhalten und in der Passivrauchbelastung in Deutschland“. Berlin: Robert Koch Institut.
- Scott, D A, und R M Palmer. 2002. „The influence of tobacco smoking on adhesion molecule profiles“. *Tobacco Induced Diseases* 1 (1): 7–25. doi:10.1186/1617-9625-1-1-7.
- Seaton, M J, und E S Vesell. 1993. „Variables affecting nicotine metabolism“. *Pharmacology & Therapeutics* 60 (3) (Dezember): 461–500.
- Seow, W K, Y H Thong, R D Nelson, G D MacFarlane, und M C Herzberg. 1994. „Nicotine-induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils“. *Inflammation* 18 (2) (April): 119–127.
- Shanker, Gouri, Jimmy L Kontos, Delrae M Eckman, Deborah Wesley-Farrington, und David C Sane. 2006. „Nicotine upregulates the expression of P2Y12 on vascular cells and megakaryoblasts“. *Journal of thrombosis and thrombolysis* 22 (3) (Dezember): 213–220. doi:10.1007/s11239-006-9033-4.
- Shen, Y, V Rattan, C Sultana, und V K Kalra. 1996. „Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes“. *The American Journal of Physiology* 270 (5 Pt 2) (Mai): H1624–1633.
- Sorensen, K E, D S Celermajer, D J Spiegelhalter, D Georgakopoulos, J Robinson, O Thomas, und J E Deanfield. 1995. „Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility“. *British Heart Journal* 74 (3) (September): 247–253.
- Sørensen, Lars Tue, Stig Jørgensen, Lars J Petersen, Ulla Hemmingsen, Jens Bülow, Steffen Loft, und Finn Gottrup. 2009. „Acute Effects of Nicotine and Smoking on Blood Flow, Tissue Oxygen, and Aerobe Metabolism of the Skin and Subcutis“. *The Journal of Surgical Research* 152 (2) (April): 224–230. doi:10.1016/j.jss.2008.02.066.
- Southwick, F S, G A Dabiri, M Paschetto, und S H Zigmond. 1989. „Polymorphonuclear leukocyte adherence induces actin polymerization by a transduction pathway which differs from that used by chemoattractants“. *The Journal of Cell Biology* 109 (4 Pt 1) (Oktober): 1561–1569.
- Speer, Paul, Yanping Zhang, Yang Gu, Michael J Lucas, und Yuping Wang. 2002. „Effects of nicotine on intercellular adhesion molecule expression in endothelial cells and integrin expression in neutrophils in vitro“. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 186 (3) (März): 551–556.
- Stein, Jeffrey J, Keri A Seymour, Kristopher G Maier, und Vivian Gahtan. 2011. „The effects of nicotine on vascular smooth muscle cell chemotaxis induced by thrombospondin-1 and fibronectin“. *American journal of surgery* 202 (5) (November): 545–548. doi:10.1016/j.amjsurg.2011.06.016.
- Stone, P C W, A C Fisher, G E Rainger, und G B Nash. 2002. „Neutrophil capture by selectins on endothelial cells exposed to cigarette smoke“. *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications* 295 (5) (August 2): 1150–1155.
- Stylianou, Ioannis M, Robert C Bauer, Muredach P Reilly, und Daniel J Rader. 2012. „Genetic basis of atherosclerosis: insights from mice and humans“. *Circulation research* 110 (2) (Januar 20): 337–355. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.230854.
- Swan, Gary E, Neal L Benowitz, Christina N Lessov, Peyton Jacob 3rd, Rachel F Tyndale, und Kirk Wilhelmsen. 2005. „Nicotine metabolism: the impact of CYP2A6 on estimates of additive genetic influence“. *Pharmacogenetics and Genomics* 15 (2) (Februar): 115–125.
- Tachmes, L, R J Fernandez, und M A Sackner. 1978. „Hemodynamic effects of smoking cigarettes of high and low nicotine content“. *Chest* 74 (3) (September): 243–246.
- Talhout, Reinskje, Thomas Schulz, Ewa Florek, Jan van Benthem, Piet Wester, und Antoon Opperhuizen. 2011. „Hazardous Compounds in Tobacco Smoke“. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (2) (Februar): 613–628. doi:10.3390/ijerph8020613.
- Taylor, K L, F Strobel, K T Yue, P Ram, J Pohl, A S Woods, und J M Kinkade Jr. 1995. „Isolation and identification of a protoheme IX derivative released during autolytic cleavage of human myeloperoxidase“. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316 (1) (Januar 10): 635–642. doi:10.1006/abbi.1995.1083.
- Terashima, T, B Wiggs, D English, J C Hogg, und S F van Eeden. 1997. „The effect of cigarette smoking on the bone marrow“. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 155 (3) (März): 1021–1026.
- Thielen, Anja, Hubert Klus, und Lutz Müller. 2008. „Tobacco smoke: unraveling a controversial subject“. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Für Toxikologische Pathologie* 60 (2-3) (Juni): 141–156. doi:10.1016/j.etp.2008.01.014.
- Tiruppathi, Chinnaswamy, Tabassum Naqvi, Yubin Wu, Stephen M Vogel, Richard D Minshall, und Asrar B Malik. 2004. „Albumin mediates the transcytosis of myeloperoxidase by means of caveolae in endothelial cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (20) (Mai 18): 7699–7704. doi:10.1073/pnas.0401712101.
- Totti, N, 3rd, K T McCusker, E J Campbell, G L Griffin, und R M Senior. 1984. „Nicotine is chemotactic for neutrophils and enhances neutrophil responsiveness to chemotactic peptides“. *Science (New York, N.Y.)* 223 (4632) (Januar 13): 169–171.
- Tracey, Kevin J. 2009. „Reflex control of immunity“. *Nature reviews. Immunology* 9 (6) (Juni): 418–428. doi:10.1038/nri2566.
- Ueno, Hirokazu, Sanjeev Pradhan, David Schlessel, Hiroyuki Hirasawa, und Bauer E Sumpio. 2006. „Nicotine enhances human vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 via protein kinase C, p38 mitogen-activated protein kinase, NF-kappaB, and AP-1“. *Cardiovascular Toxicology* 6 (1): 39–50.
- Vadseth, Caryn, Jose M Souza, Leonor Thomson, Amy Seagraves, Chandrasekaran Nagaswami, Tomas Scheiner, Jim Torbet, u. a. 2004. „Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species“. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (10) (März 5): 8820–8826. doi:10.1074/jbc.M306101200.
- Vassallo, Robert, Paula R Kroening, Joseph Parambil, und Hirohito Kita. 2008. „Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses“. *Molecular Immunology* 45 (12) (Juli): 3321–3329. doi:10.1016/j.molimm.2008.04.014.
- Vazquez-Padron, Roberto I, Dania Mateu, Luis Rodriguez-Menocal, Yuntao Wei, Keith A Webster, und Si M Pham. 2010. „Novel role of Egr-1 in nicotine-related

- neointimal formation“. *Cardiovascular research* 88 (2) (November 1): 296–303. doi:10.1093/cvr/cvq213.
- Wada, Tsutomu, Maiko Naito, Hiroki Kenmochi, Hiroshi Tsuneki, und Toshiyasu Sasaoka. 2007. „Chronic nicotine exposure enhances insulin-induced mitogenic signaling via up-regulation of alpha7 nicotinic receptors in isolated rat aortic smooth muscle cells“. *Endocrinology* 148 (2) (Februar): 790–799. doi:10.1210/en.2006-0907.
- Wang, Hong, Man Yu, Mahendar Ochani, Carol Ann Amella, Mahira Tanovic, Seenu Susarla, Jian Hua Li, u. a. 2003. „Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation“. *Nature* 421 (6921) (Januar 23): 384–388. doi:10.1038/nature01339.
- Wenningmann, I, und J P Dilger. 2001. „The kinetics of inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by (+)-tubocurarine and pancuronium“. *Molecular Pharmacology* 60 (4) (Oktober): 790–796.
- Willimas, R. 1971. „Development of a cigarette with increased smoke pH“. Trial exhibit 11903.
- Winterbourn, C C, M C Vissers, und A J Kettle. 2000. „Myeloperoxidase“. *Current Opinion in Hematology* 7 (1) (Januar): 53–58.
- Woodfin, Abigail, Mathieu-Benoit Voisin, und Sussan Nourshargh. 2010. „Recent developments and complexities in neutrophil transmigration“. *Current Opinion in Hematology* 17 (1) (Januar): 9–17. doi:10.1097/MOH.0b013e3283333930.
- Xu, Minqi, James E Scott, Kan-Zhi Liu, Hannah R Bishop, Diane E Renaud, Richard M Palmer, Abdel Soussi-Gounni, und David A Scott. 2008. „The influence of nicotine on granulocytic differentiation – Inhibition of the oxidative burst and bacterial killing and increased matrix metalloproteinase-9 release“. *BMC Cell Biology* 9 (1): 19. doi:10.1186/1471-2121-9-19.
- Yong, T, M Q Zheng, und D S Linthicum. 1997. „Nicotine induces leukocyte rolling and adhesion in the cerebral microcirculation of the mouse“. *Journal of Neuroimmunology* 80 (1-2) (Dezember): 158–164.
- Zeiber, A M, V Schächinger, und J Minners. 1995. „Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function“. *Circulation* 92 (5) (September 1): 1094–1100.
- Zeng, J, und R E Fenna. 1992. „X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution“. *Journal of Molecular Biology* 226 (1) (Juli 5): 185–207.
- Zhang, Chunxiang, Jian Yang, Jonathan D Jacobs, und Lisa K Jennings. 2003. „Interaction of myeloperoxidase with vascular NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in vasculature: implications for vascular diseases“. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 285 (6) (Dezember): H2563–2572. doi:10.1152/ajpheart.00435.2003.
- Zhang, Guoqiang, Amanda L Marshall, Alison L Thomas, Kelly A Kernan, Yanyuan Su, Renee C LeBoeuf, Xiu Rong Dong, und B N Angela Tchao. 2011. „In vivo knockdown of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 1$ diminishes aortic atherosclerosis“. *Atherosclerosis* 215 (1) (März): 34–42. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.057.
- Zhang, R, M L Brennan, X Fu, R J Aviles, G L Pearce, M S Penn, E J Topol, D L Sprecher, und S L Hazen. 2001. „Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease“. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 286 (17) (November 7): 2136–2142.
- Zhen, Yao, Yin Ruixing, Bi Qi, und Wu Jinzhen. 2008. „Nicotine potentiates vascular endothelial growth factor expression in balloon-injured rabbit aortas“. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 26 (5) (Oktober): 284–292. doi:10.1080/08977190802292640.

Zia, S, A Ndoye, V T Nguyen, und S A Grando. 1997. „Nicotine enhances expression of the alpha 3, alpha 4, alpha 5, and alpha 7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells“. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 97 (3) (September): 243–262.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die es mir möglich gemacht haben, diese Projekt zu verwirklichen und diese Arbeit beenden zu können.

Diese Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie durchgeführt. Mein Dank gilt daher dem ehemaligen Leiter dieser Abteilung Prof. Dr. med. Thomas Meinertz sowie dem jetzigen Klinikdirektor Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg.

Allen voran möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. Stephan Baldus bedanken, der sein Vertrauen und seine Geduld in mich gesetzt hat und mir dieses Thema überlassen hat. Unter seiner Leitung und Weisung sowie der konstruktiven Zusammenarbeit konnte ich die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens erlernen und mich durch ihn stets für die Wissenschaft begeistern.

Der größte Dank gebührt allerdings meiner Betreuerin, Dr. rer. nat. Anna Klinke. Sie war Ideengeber, treibende Kraft und geduldiger Lehrer zugleich. Ihre Betreuung war vorbildhaft und einzigartig. Danke.

Ein großer Dank gilt auch Dr. rer. nat. Denise Lau und Hartwig Wieboldt. Sie standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

9 Lebenslauf

Name: Andreas Udo Muth
Geburtsdatum: 30.05.1983 in Nürnberg
Eltern: Elke Muth, geb. Latzkow, Lehrerin
Dr. med. Heinz Muth, Arzt

Schulbildung

2004 Allgemeine Hochschulreife, Wilhelm Löhe Gymnasium, Nürnberg

Hochschulausbildung

2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
2006-2011 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004-2006 Studium der Humanmedizin, Semmelweis-Universität, Budapest , Ungarn

Berufserfahrung

2010-2011 PJ-Tertial 1: Chirurgie, Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika
PJ-Tertial 2: Innere Medizin, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
PJ-Tertial 3: Anästhesie, Berufsgenossenschaftliches Unfallkrankenhaus,
Hamburg
2006-2010 Famulatur Kardiologie, Universitäres Herzzentrum, Hamburg
Praxisfamulatur Internistische Gemeinschaftspraxis Dr. med. L. Reichel,
Dr. med. T. Sorgenfrei, Dr. med. K. Akrivakis, Hamburg-Altona
Famulatur Innere Medizin, Krankenhaus Lauf an der Pegnitz
2005-2006 Auslands-Pflegepraktikum, Budapest, Ungarn
Pflegepraktikum Chirurgie, Krankenhaus Lauf an der Pegnitz
Pflegepraktikum Pädiatrie, Klinikum Hallerwiese, Nürnberg

Berufliche Tätigkeit

2012 Assistenzarzt in der Klinik für Herzchirurgie des Universitären Herzzentrums,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: