

Aus der Medizinischen Klinik III
Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. T. Meinertz

**Wirkung von Sauerstoffradikalen auf die Endothelin-1-Synthese in
humanen Arteria mammaria interna-Gefäßen
ex vivo**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Björn Sill
aus Stralsund

Hamburg Januar 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Meiner Familie

1. Arbeitshypothese & Fragestellung.....	5
2. Einleitung.....	6
2.1. Endothel und Arteriosklerose.....	6
2.2. Funktionen des Endothels.....	7
2.3. Endothelin.....	8
2.3.1. Struktur und Metabolismus der Endotheline.....	8
2.3.2. Effektormechanismen des Endothelin-1.....	11
2.3.3. Spezielle Bedeutung von Endothelin-1.....	12
2.3.4. Regulation der Endothelin-1-Synthese.....	15
2.3.5. Endothelin-1-Rezeptor Blockade.....	16
2.4. Angiotensin II.....	17
2.4.1. Das Angiotensin-System.....	17
2.4.2. Die intrazelluläre Signaltransduktion und Beziehung zum Endothelin-1.....	18
2.5. Oxidativer Stress.....	19
2.5.1. Bedeutung von oxidativem Stress.....	20
2.5.2. Interaktion von reaktiven Sauerstoffspezies und ET-1.....	21
3. Material & Methoden.....	22
3.1. Gewinnung von Arteria mammaria interna Segmenten.....	22
3.1.1. Probegruppen.....	22
3.1.2. Vorbereiten des Transportmediums.....	23
3.1.3. Beschaffung aus dem Herz-OP.....	23
3.1.4. Präparation der Segmente.....	23
3.2. Inkubation für die histologische Auswertung.....	25
3.2.1. Vorbereitung für die Inkubation.....	25
3.2.2. Herstellen der Inkubationslösungen.....	26
3.2.2.1. Benötigte Materialien.....	26
3.2.2.2. Herstellen einer 0,1 molaren Xanthin-Lösung.....	26
3.2.2.3. Inkubationsmedium mit Xanthin-Oxidase.....	27
3.2.2.4. Inkubationsmedium mit Xanthin-Oxidase + SOD + Catalase.....	27
3.2.3. Durchführung der Inkubation.....	27

3.3.	Inkubation für die Auswertung mittels ELISA	28
	3.3.1. Benötigte Materialien	28
	3.3.2. Inkubationsmedium mit Angiotensin II	28
	3.3.3. Durchführung der Inkubation	28
3.4.	Präparation der Proben und Kontrollen für histologische die Aufarbeitung	29
	3.4.1. Herstellen von Kryoschnitten	29
	3.4.1.1. Benötigtes Material	29
	3.4.1.2. Herstellen von Kryoblöcken durch verschiedene Einfriermethoden	29
	3.4.1.3. Schneiden der Kryoblöcke	30
	3.4.2. Einfrieren und Lagern im -80 °C Kühlschrank	30
3.5.	Histologische Aufarbeitung	31
	3.5.1. Hämalaun-Färbung	31
	3.5.1.1. Benötigte Materialien	31
	3.5.1.2. Durchführung der Färbung	31
	3.5.2. Peroxidase-Färbung	31
	3.5.2.1. Benötigte Materialien	31
	3.5.2.2. Durchführung der Färbung	32
	3.5.3. ABC-AP-Färbung	32
	3.5.3.1. Benötigte Materialien	32
	3.5.3.2. Durchführung der Färbung	33
	3.5.4. Cy TM -Färbung	33
	3.5.4.1. Benötigte Materialien	33
	3.5.4.2. Durchführung der Färbung	33
	3.5.5. α -Smooth Muscle Actin-Färbung	34
	3.5.5.1. Benötigte Materialien	34
	3.5.5.2. Durchführung der Färbung	34
3.6.	Semiquantitative Bestimmung des Big-Endothelins durch Cy TM - Färbung	35
	3.6.1. Mikroskopie	35
	3.6.2. Fotodokumentation	35
	3.6.3. Bestimmung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität	35

3.7.	ELISA.....	35
	3.7.1. Benötigte Materialien und Geräte.....	35
	3.7.2. Vorbereitung der Proben.....	36
	3.7.3. Prinzip des Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA).....	37
	3.7.4. Versuchsdurchführung.....	38
	3.7.5. Messung der Extinktion und Erzeugen der Kalibrationsgeraden.....	38
3.8.	Verwendete Lösungen.....	39
3.9.	Verwendete Chemikalien.....	40
4.	Ergebnisse.....	41
4.1.	Verschiedene Einfriermethoden.....	41
	4.1.1. Kühlen von n-Hexan in flüssigem Stickstoff.....	41
	4.1.2. Kühlen von n-Hexan auf 4 °C.....	41
	4.1.3. Einfrieren direkt im flüssigen Stickstoff.....	41
4.2.	Ergebnisse der Histologie.....	42
	4.2.1. Hämalaun-Färbung.....	42
	4.2.2. Peroxidase-Färbung.....	43
	4.2.3. ABC-AP-Färbung.....	45
	4.2.4. Cy TM -Färbung.....	48
	4.2.5. α -Smooth Muscle Actin-Färbung.....	51
4.5.	Auswertung der semiquantitativen Bestimmung des Big-Endothelins.....	52
4.6.	ELISA.....	59
	4.6.1. Ergebnisse des Big-Endothelin-ELISA.....	59
5.	Diskussion.....	63
5.1.	Die Wirkung von Sauerstoffradikalen auf die Endothelin-1-Protein-Konzentration.....	65
5.2.	Wirkung von Angiotensin II auf die Endothelin-1-Protein- Konzentration.....	66
5.3.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	67

6. Zusammenfassung.....	69
7. Literaturverzeichnis.....	70
8. Tabellen- & Abbildungsverzeichnis.....	81
9. Abkürzungsverzeichnis.....	83
10. Danksagung.....	86
11. Lebenslauf.....	87
12. Erklärung.....	88

1. Arbeitshypothese & Fragestellung

Endothelin-1 und Sauerstoffradikale sind Vasokonstriktoren, die kurzfristig die Vasomotorik und langfristig strukturelle Umbauvorgänge beeinflussen.

Endothelin-1 wird unter oxidativem Stress vermehrt gebildet. An Endothelzellen und Gefäßwandmyozyten konnte unsere Arbeitsgruppe bereits anhand von In-Vitro-Experimenten belegen, dass Sauerstoffradikale zur Aktivierung des Endothelin-1-Promotors, zur Steigerung der Endothelin-1-mRNA-Synthese und konsekutiv zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen von Big-Endothelin-1 führen (Kähler, Mendel et al. 2000; Kähler, Ewert et al. 2001; Kähler, Sill et al. 2002). Sowohl Endothelin-1 als auch reaktive Sauerstoffspezies sind an der Genese und Aggravierung pathologischer Veränderungen im kardiovaskulären System beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit soll an intakten, frisch gewonnenen Arteria mammaria interna-Segmenten untersucht werden, ob die an kultivierten Zellen beobachteten Effekte auch ex vivo nachzuweisen sind.

Daraus ergaben sich folgende Zielsetzungen für diese Arbeit:

1. Optimierung der Inkubation, Präparation und Fixierung für die Histologie der Arteria mammaria interna
2. Inkubation mit Sauerstoffradikalen und Angiotensin II (Generation des oxidativen Stresses durch das Reaktionssystem Xanthin/Xanthin-Oxidase (X/XO))
3. Messung des Effektes durch computergestützter Quantifizierung und ELISA

2. Einleitung

2.1. Endothel und Arteriosklerose

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems zählen zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Beeinflussbare Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, Rauchen, Bluthochdruck und Diabetes mellitus begünstigen die Entwicklung und Progression einer manifesten Arteriosklerose (Riede und Schäfer 1995, Schmaizl 1995). Häufig sind Halsschlagader, Koronararterien oder die peripheren Extremitätenarterien betroffen. Nur ein intaktes, voll funktionierendes Endothel kann als Barriere zwischen VSMC und mitogenen sowie chemotaktischen Substanzen die Entwicklung einer Arteriosklerose verhindern (Furchgott and Zawadzki 1980). Bedingt durch die Lage des Endothels ist es schädlichen Einflüssen besonders ausgesetzt. Im Frühstadium der Arteriosklerose kommt es zur Veränderung der Struktur der Gefäßendothelzellen und zur Zunahme der Dichte und des Zellumsatzes. Im fortgeschrittenen Stadium geht die Kontinuität des Endothels durch Plaquerupturen verloren. Durch fehlende Regeneration steht die Media dann im direkten Kontakt zum Blut und ist vasokonstriktorisches und mitogenen Faktoren direkt ausgeliefert. Endothelabhängige Vasodilatoren, wie Serotonin, Azetylcholin, Thrombin und ADP können dann bei direktem Kontakt mit der glatten Gefäßmuskulatur paradoxe konstriktorische Effekte auslösen (Schmidt Thews 1995). Gefäßspastische Phänomene werden vor allem bei arteriosklerotisch veränderten Arterien beobachtet (Marzilli, Goldstein et al. 1980; Maseri 1984). Im weiteren Verlauf der Arteriosklerose kommt es aufgrund des chronischen Entzündungsreizes und der vermehrten Produktion von mitogenen Substanzen zur unkontrollierten neointimalen Hyperplasie und Akkumulation von Lymphozyten, Fibroblasten und Myozyten (Weidinger, McLenachan et al. 1991).

Die endotheliale Dysfunktion ist der Grundstein für die Entstehung vieler kardiovaskulärer Erkrankungen. Die gestörte Endothelfunktion prädisponiert zur Entwicklung von Arteriosklerose, Hypertonie, Thrombosen und Vasospasmen (Quaschnig, Ruschitzka et al. 2000).

2.2. Funktionen des Endothels

Die Gefäßwand der großen Arterien weist eine dreischichtige Struktur, bestehend aus Intima, Media und Adventia, auf. Die lumenferne Adventitia stellt den Kontakt zum umliegenden Gewebe her. Die Media besteht vor allem aus glatter Gefäßmuskulatur, aber auch aus elastischem Bindegewebe und ist entscheidend für den Gefäßtonus verantwortlich. Die lumenwärts gelegene Intima besteht aus dem Endothel, der Basalmembran und dem angrenzenden subendothelialen Raum. Sie steht im direkten Kontakt zum Blut und dessen Bestandteilen. Die Endothelzellen der Intima sind über so genannte „Tight Junctions“ untereinander in Verbindung und gewährleisten eine kontinuierliche Auskleidung des Gefäßlumens.

Das Endothel ist nicht nur eine Barriere zwischen intra- und extravasalem Raum, sondern stellt ein eigenständiges und endokrin aktives Organ dar (Busse, Fleming et al. 1993). Es reguliert das vaskuläre Zellwachstum, die Gefäßwandreparatur, moduliert den Gefäßtonus, greift in die Hämostase ein und moduliert immunologische Prozesse (Vanhoutte 1988; Busse, Fleming et al. 1993; Griendling and Alexander 1996). Die Hämostase wird sowohl mechanisch als auch plasmatisch durch das gesunde Endothel gehemmt. Es trennt die Thrombozyten vom koagulatorisch wirkenden Kollagen. Durch die Synthese von antikoagulatorisch wirkenden Substanzen, wie z.B. Heparansulfat und Protein C, wird die plasmatische Gerinnung inaktiviert bzw. gehemmt. Die Aktivierung der Thrombozyten durch Degranulation wird durch endotheliales Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin gehemmt (Moncada and Vane 1980; O'Grady, Warrington et al. 1980; Moncada and Higgs 1987; Vanhoutte, Auch-Schwelk et al. 1989). Thromben werden mit Hilfe des im Endothel gebildeten Tissue Plasminogen Activator (t-PA) aufgelöst. Nur durch ein intaktes Endothel kann dieses Gleichgewicht koagulatorischer und antikoagulatorischer Mechanismen gewährleistet werden.

Den entscheidenden Einfluss auf die lokale Vasomotorik wird durch den 1980 erstmals von Furchgott und Zawadzki beschriebenen Endothelium derived growth factor bestimmt (Furchgott and Zawadzki 1980). Dieser Faktor wurde 1987 durch Palmer et al. als NO identifiziert (Palmer, Ferrige et al. 1987). Die NO-Bildung erfolgt durch Abspaltung der Nitrogruppe vom L-Arginin, katalysiert durch die Wirkung der NO-Synthetase. Verminderte Spiegel von NO sind von entscheidender Bedeutung für Bluthochdruck, Vasospasmen vor allem geschädigter Gefäße und der Progression der Arteriosklerose (Busse, Fleming et al. 1993).

Vasoaktive Substanzen wie Azetylcholin, Histamin, Adenosinphosphat, Endothelin-1 und Thrombin stimulieren endotheliale Rezeptoren und haben über die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels Einfluss auf die lokale Vasomotorik der Arterie (Freay, Johns et al. 1989; Momose, Fukuo et al. 1993). Nicht nur biochemische Einflüsse sind entscheidend für die Aktivierung von endothelialen Effektorsubstanzen, sondern auch die durch Scherkräfte ausgelöste mechanische Reizung von Rezeptoren. Diese Scherkräfte können durch Blutdruck, Blutfluss und Viskosität des Blutes beeinflusst werden.

2.3. Endothelin

Als funktionellen Antagonisten zum NO wurde durch Hickey 1985 die Existenz eines konstriktorisch wirksamen endothelialen Faktors beschrieben (Hickey, Rubanyi et al. 1985), der durch Yanagisawa 1988 als das vasokonstriktorisch hochpotente Endothelin-1 identifiziert werden konnte (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988).

2.3.1. Struktur und Metabolismus der Endotheline

Endothelin ist der stärkste bisher bekannte endogene Vasokonstriktor (Schmidt, Thews 2000). Der vasokonstriktorische Effekt ist kurzfristig, die Beeinflussung der Gefäßwandphysiologie hingegen langfristig. Es ist ein autokrin-parakrin wirkendes Peptidhormon, welches mit anderen vasoaktiven Substanzen interagiert und neben der vasokonstriktiven vor allem proliferationsinduzierende Eigenschaften besitzt (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988; Arai, Hori et al. 1990; Imai, Hirata et al. 1992). Im menschlichen Genom codieren drei Gene für verschiedene, aber strukturell ähnliche Endotheline: Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). ET-1 besitzt die stärkste vasokonstriktorische Potenz und ET-3 die schwächste. Diese Wirkungen lassen sich durch unterschiedliche Affinitäten zum Endothelin-Rezeptor-A (ET_A) erklären, wobei ET-1 und ET-2 eine 10-fach höhere Affinität haben als ET-3 (Arai, Hori et al. 1990). Die Affinitäten zum Endothelin-Rezeptor-B (ET_B) ist diesen drei Isoformen gleich und führt zur Vasodilatation (Kohan, Padilla et al. 1993). Zusätzlich konnte bei Mäusen und Ratten noch das Endothelin-4 (ET-4) identifiziert werden, das als Vasoactive Intestinal Constrictor bezeichnet wird und dem humanen ET-2 identisch ist (Bloch, Hong et al. 1991).

Alle Isoformen, bestehend aus 21 Aminosäuren, besitzen eine intramolekulare bitykliche Ringstruktur und haben ein Molekulargewicht von 2492 Dalton. Die Ringstruktur wird durch zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten Cys1-Cys15 und Cys3-Cys11 gebildet. Außerdem weisen sie ein hydrophobes C-terminales Ende mit der Aminosäure Tryptophan an Position 21 auf (s. Abbildung 1) (Yanagisawa, Inoue et al. 1988). Die Position dieser Aminosäure ist entscheidend für die vasokonstriktorsiche Potenz des Endothelins (Kimura, Kasuya et al. 1988). Wird Tryptophan von der Position 21 entfernt, so verringert sich die vasokonstriktorische Potenz auf ein Drittel.

Kürzlich konnte zusätzlich neben dem ET-1₍₁₋₂₁₎ das ET-1₍₁₋₃₂₎ nachgewiesen werden. Dieses wird durch die Metalloprotease-2 (MMP-2) hauptsächlich in glatten Muskelzellen gebildet und ist ein deutlich potenterer Vasokonstriktor als ET-1₍₁₋₂₁₎ (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999).

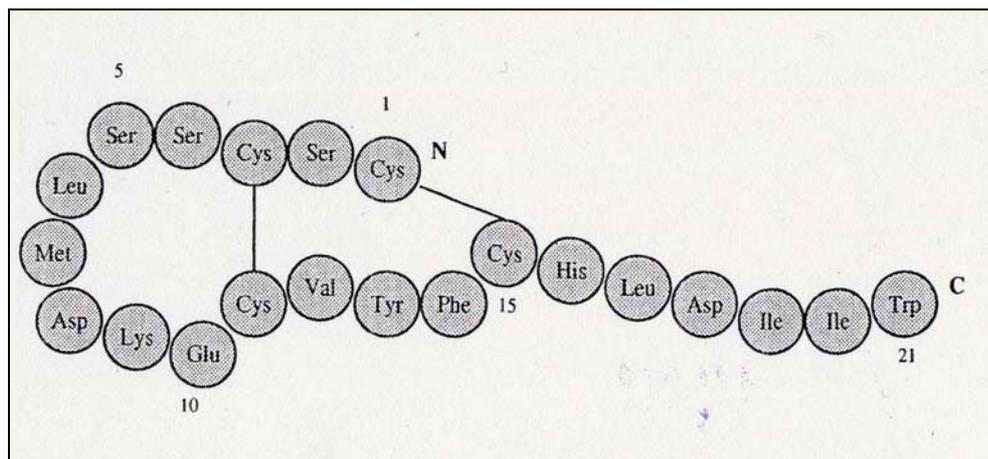


Abbildung 1 Aminosäuresequenz des Endothelin-1 (ET-1₍₁₋₂₁₎)

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Endothelin-1. Bedeutsam sind die 2 Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten Cys1-Cys15 und Cys3-Cys11, außerdem die C-terminal lokalisierte Aminosäure Tryptophan. Quelle: (Dissertation Weckmüller 1998).

Das Schlangentoxin Sarafatoxin, der ägyptischen Natter, besitzt Strukturverwandtschaft zu den Endothelinen und ist ebenfalls ein Vasokonstriktor.

Die Proteine werden durch proteolytische Spaltung aus der Vorform Pre-Pro-Endothelin-1 (212 AS) zu Pro-Endothelin-1 (38 AS), katalysiert durch eine Endopeptidase, gebildet. Pro-Endothelin-1 (Big-Endothelin) wird mit Hilfe entweder des Endothelin-Converting-Enzyms (ECE-1), bestehend aus 4 Isoformen a,b,c und d (Schweizer, Valdenaire et al. 1997; Valdenaire, Lepailleur-Enouf et al. 1999), Chymase,

ECE-2 oder Non-ECE-Metalloproteasen oder MMP-2 zur endgültigen Form, dem Endothelin-1 gespalten (Wypij, Nichols et al. 1992; Shimada, Takahashi et al. 1994; Xu, Emoto et al. 1994; Miyauchi and Masaki 1999). ECE sind in Endothel-, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten und Makrophagen lokalisiert (Maguire, Johnson et al. 1997; Minamino, Kurihara et al. 1997; Schweizer, Valdenaire et al. 1997; Kobayashi, Miyauchi et al. 1998). Sie gehören zur Familie der Metalloproteasen und sind in Funktion und Struktur den neutralen Endopeptidasen und dem Kell-Protein sehr ähnlich (Turner and Tanzawa 1997).

Endothelin-1 ist die Hauptform beim Menschen. Hauptbildungsort sind die Endothelzellen. Andere Zelltypen, wie glatte Gefäßwandmuskel-, (Yu and Davenport 1995) Mesangial-, (Sakamoto, Sasaki et al. 1990) Nerven- (MacCumber, Ross et al. 1990) und Epithelzellen können ebenso Endothelin-1 bilden. In Niere und Nervensystem werden vor allem ET-2 und ET-3 gebildet, welche keine speziellen Wirkungen an Herz und Gefäßen besitzen (Shinmi, Kimura et al. 1989; Kähler, Köster et al. 1997). Durch die Einwirkung verschiedener Substanzen, z.B. Thrombin, Adrenalin, Interleukin-1, Angiotensin II, Kalziumionen und Endotoxinen, wird ET-1 aus den Vorstufen gebildet und sezerniert (Yoshizumi, Kurihara et al. 1990; Emori, Hirata et al. 1992; Imai, Hirata et al. 1992). Die Bildung des ET-1 wird hingegen durch das atriale natriuretische Peptid (ANP), Heparin und durch Nitroglyzerin gehemmt (Saijonmaa, Ristimaki et al. 1990; Yokokawa, Kohno et al. 1993; Yokokawa, Tahara et al. 1993), Schmidt, Thews 2000). Endothelin-1 ist nur kurz nachweisbar, da die biologische Halbwertszeit 5 min beträgt. Die Elimination erfolgt zu 90% über die Lungenstrombahn. Nur ein geringer Anteil wird renal ausgeschieden (Abassi, Tate et al. 1992).

2.3.2. Effektormechanismen des Endothelin-1

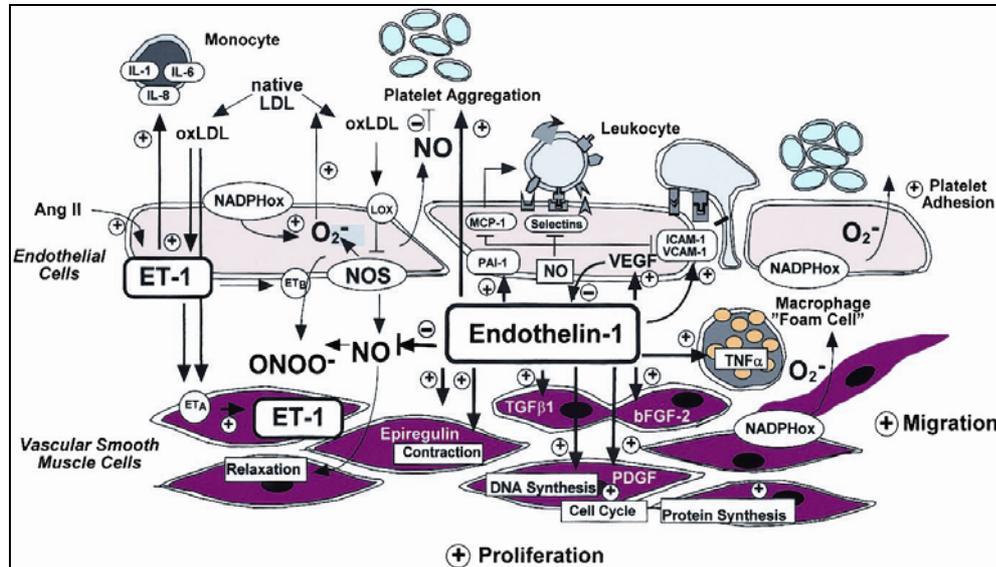


Abbildung 2 Vaskuläre Effekte des ET-1

Dargestellt ist die Bildung des ET-1 durch oxidiertes LDL und Angiotensin II in Endothelzellen und VSMC. Die Stimulation des ET_B-Rezeptors bewirkt die Freisetzung von NO und die des ET_A-Rezeptors Kontraktion und Zellproliferation. ET-1 stimuliert die Bildung von IL-1 und TNF-α. Zellproliferation wird durch Steuerung der DNA-Synthese gesteigert. Quelle: (Lüscher and Barton 2000)

Durch die Stimulation der Endothelinrezeptoren ET_A und ET_B durch ET-1 wird eine G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion ausgelöst. Die Rezeptorsubtypen sind strukturverwandt, haben jedoch unterschiedliche Verteilungen im Gewebe. So synthetisieren Gefäßwandmyozyten und Kardiomyozyten vor allem den Endothelin-A-Rezeptor (ET_A) (s. Abbildung 2). Durch die Aktivierung des G-Proteins intrazellulär wird die Katalyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol durch die Proteinkinase C ermöglicht. Proteinkinase C ist die zentrale Rolle bei der muskulären Kontraktion (Miller, Pelton et al. 1993; Tamirisa, Frishman et al. 1995) und bei der Vermittlung von mitogenen Eigenschaften des Endothelins (Simonson and Herman 1993). Inositoltriphosphat bindet an intrazellulären Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums und bewirkt so die Freisetzung von Kalziumionen (Tamirisa, Frishman et al. 1995). Dabei ist die Anstiegsgeschwindigkeit der Freisetzung der Kalziumionen sowie deren Menge abhängig von der Konzentration des Endothelins (Marsden, Danthuluri et al. 1989). Der ET_B-Rezeptor wird vor allem durch die Endothelzellen exprimiert (Abbildung 2). Die Stimulation dieser Rezeptoren bewirkt hauptsächlich die Freisetzung von Vasodilantien, wie NO und Prostazyklin

(PGI₂), aus den Endothelzellen (Filep, Herman et al. 1991; Hirata, Emori et al. 1993; Tamirisa, Frishman et al. 1995). Die Stimulation der ET_B-Rezeptoren der Gefäßwandmyozyten führt zur Vasodilatation (Seo, Oemar et al. 1994). Diese Eigenschaften des Endothelins können als Ursache für die vorübergehende Vasodilatation und die anschließende lang anhaltende Kontraktion mit Erhöhung des systolischen Blutdrucks herangezogen werden (McGraw-Hill, 1999). Dieser Effekt ist am stärksten bei intravenöser Applikation zu beobachten (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988; Inoue, Yanagisawa et al. 1989; Shiba, Yanagisawa et al. 1989). Zusätzlich wird auch die Wirkung von anderen Vasokonstriktoren, z.B. Serotonin und Norepinephrin, durch Endothelin potenziert (McGraw-Hill, 1999). Eine Imbalance in diesem System kann Vasospasmus und die Entwicklung einer Arteriosklerose bewirken.

Ein dritter Endothelin Rezeptor (ET_C) ist vor allem im zentralen Nervensystem lokalisiert (Shinmi, Kimura et al. 1989). Dieser hat die Funktion, das Wachstum und die Differenzierung zu steuern (Kähler, Köster et al. 1997). Die Up- und Downregulation der Rezeptoren richtet sich nach der Konzentration des Endothelins (Hirata, Yoshimi et al. 1988).

2.3.3. Spezielle Bedeutung von Endothelin-1

Da Endothelin lokale Effekte durch parakrin-autokrine Sezernierung aufweist, reflektiert der Endothelinplasmaspiegel nicht die tatsächliche Konzentration. 75% des sezernierten Endothelins gelangt nach abluminal und kann daher nicht im Plasma erfasst werden. (Yoshimoto, Ishizaki et al. 1991; Fan, Unoki et al. 2000). Trotzdem konnte sowohl unter experimentellen Bedingungen (Margulies, Hildebrand et al. 1990) als auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (Leppaluoto and Ruskoaho 1992; McMurray, Ray et al. 1992) erhöhte Endothelinkonzentrationen gemessen werden. Bei Arteriosklerose, Myokardinfarkt, pulmonalerterieller Hypertonie und Niereninsuffizienz waren sowohl im Gewebe als auch im Plasma die ET-1-Level erhöht (Lerman, Edwards et al. 1991; Stewart, Kubac et al. 1991; Giaid, Yanagisawa et al. 1993; Benigni and Remuzzi 1997). Bei der chronischen Herzinsuffizienz besteht zudem eine positive Korrelation zwischen der Konzentration des ET-1 im Plasma und den Parametern der eingeschränkten linksventrikulären Pumpfunktion, so dass dieser Wert eine prognostische Aussage zulässt (Wei, Lerman et al. 1994). Durch Ischämie und mechanische Alteration (z.B. Ballonangioplastie) werden ebenfalls erhöhte ET-1-

Konzentrationen erreicht (Firth and Ratcliffe 1992; Douglas, Loudon et al. 1994; Wang, Douglas et al. 1996).

Um die Bedeutung des Endothelins für die kardiovaskulären Erkrankungen besser zu verstehen, wurde eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt (Fan, Unoki et al. 2000; Touyz and Schiffrin 2003). In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die atherogen wirkenden „Low Density Lipoprotein“ (LDL) in vitro die Endothelinsynthese stimulieren (Boulanger and Lüscher 1990). Aufgrund der vasokonstriktorischen Eigenschaften des ET-1 wurde ferner dieses Hormon als Ursache von Vasospasmen bei morphologisch unauffälligen Gefäßen angesehen. Patienten mit einer vasospastischen Angina pectoris (Lüscher 1989), sowie Patienten mit einem Raynaud-Syndrom (Stoyneva, Lyapina et al. 2003) hatten bei diesen Untersuchungen erhöhte Endothelin-1 Spiegel.

Außer der vasokonstriktorischen Eigenschaft des Endothelins ist die Fähigkeit mitogen zu wirken, vom hohen Interesse (Bousette and Giaid 2003). So kann ET-1 die DNA-Synthese in Gefäßwandmyozyten, Kardiomyozyten, Fibroblasten, Gliazellen und Mesangiumzellen stimulieren (Ito, Hirata et al. 1991; Hassoun, Thappa et al. 1992; Simonson and Herman 1993; Tamirisa, Frishman et al. 1995). In Experimenten wurde bereits die Stimulation zur Proliferation von glatten Muskelzellen durch erhöhte Konzentrationen von Endothelin-1 belegt (Davis, Hogarth et al. 2003; Liu, Chen et al. 2003; Zeidan, Broman et al. 2003). Die Endotheline sind entscheidend an der Proliferation und Differenzierung durch Beeinflussung der Genexpression beteiligt. In stimulierten glatten Muskelzellen wurden erhöhte mRNA-Konzentrationen der Protoonkogen-Produkte c-fos und c-myc nachgewiesen (Ito, Hirata et al. 1991). Eine zentrale Rolle wird dem Endothelin auch beim vaskulären Remodeling zugeschrieben. So konnte die Verbindung zwischen dieser vaskonstriktiven und mitogenen Substanz und der Initiation sowie Progression der Intimaverdickung nachgewiesen werden (Yamauchi, Kurosaki et al. 2002; Nakatani, Tanabe et al. 2003). Endothelin-1 kann mittels Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren indirekt die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen sowie die Synthese extrazellulärer Matrix und Neoangiogenese steuern (Hassoun, Thappa et al. 1992; Battistini, Chailier et al. 1993).

Durch diese molekularen Mechanismen werden Induktion und Progression hypertropher, hyperplastischer und fibrotischer Gewebeveränderungen begünstigt. Diese Mechanismen tragen entscheidend zum pathologischen Remodeling des Myokards und der Gefäßwände bei und machen das Auftreten einer chronischen Herzinsuffizienz und Arteriosklerose wahrscheinlicher. Durch die Stimulation der ET_B-Rezeptoren kann das infiltrative Tumorwachstum beispielsweise beeinflusst werden. Dabei wird die Neovaskularisation durch Proliferation, Migration, Invasion, Proteasenproduktion und Morphogenese moduliert (Bagnato and Spinella 2003).

Desweiteren wird, wie bereits in Kapitel 2.3.2. beschrieben, die Potenz von vasokonstriktiven Substanzen, wie AT II, Katecholaminen und Serotonin, durch ET-1 verstärkt (Touyz and Schiffrin 2003). Besonders die Wechselwirkungen mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) sind vom pharmakologischen Interesse. Es besteht eine enge Beziehung zwischen Endothelin-1 und Angiotensin II (Ozawa, Hasegawa et al. 2003). Die Synthese von PPET-1-mRNA wird durch Angiotensin II stimuliert (Imai, Hirata et al. 1992).

Plasma ET-1 Konzentrationen sind bei hypercholesterinämischen Tieren erhöht. So waren bei Mäusen mit einem apoE-KO-Gen die ET_B-Rezeptoren an der Zelloberfläche von Schaumzellen erhöht (Fan, Unoki et al. 2000). LDL stimuliert die Synthese von ET-1 und HDL hingegen hemmt diesen Effekt (Fan, Unoki et al. 2000). In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Endothelin-Konzentration in arteriosklerotischen Läsionen mit Anzahl und Aktivität der Läsionen korreliert (Lerman, Edwards et al. 1991; Zeiher, Goebel et al. 1995; Bousette and Giaid 2003). Den Endothelinen wird aber auch ein zytokinartiges Wirkungsprofil zugeschrieben (Massai, Carbotti et al. 2003; Nath, Kanakiriya et al. 2003). Sie wurden deshalb auch als Entzündungsmediatoren bezeichnet (Zeiher, Goebel et al. 1995). Diese zahlreichen Eigenschaften der Endotheline in den verschiedensten Abläufen, physiologischer, aber vor allem pathophysiologischer Vorgänge einzugreifen, macht die Identifizierung weiterer Funktionen und Wirkungen bedeutsam.

2.3.4. Regulation der Endothelin-1 Synthese

Die Endothelin-Synthese wird durch AT II, Thrombin, oxidativ modifiziertes LDL und Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- β oder EGF stimuliert (Resink, Hahn et al. 1990; Emori, Hirata et al. 1992; Imai, Hirata et al. 1992). Weitere Faktoren sind Katecholamine, Vasopressin, Interleukin-1, Endotoxine und Kalziumionen (Yoshizumi, Kurihara et al. 1990; Redmond, Cahill et al. 1996). Durch oxidativen Stress wird die Konzentration von ET-1 in glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen erhöht (Kähler, Ewert et al. 2001; Kähler, Sill et al. 2002). Mechanische Reizung der Gefäße durch Scherstress (Malek and Izumo 1992) und Endothelläsionen sind zusätzlich physikalische Reize, die die Endothelin-Sekretion senken bzw. steigern. (Touyz and Schiffrin 2003). Körperliches Training erhöht die ET-1-Expression des Myokards. Das zeigt, dass Endothelin für die Aufrechterhaltung der Herzfunktion eine bedeutsame und wichtige Funktion hat (Maeda, Miyauchi et al. 1998).

Hemmende Wirkung auf die Endothelin-Sekretion und Synthese haben u.a. Heparin, ANP, c-GMP, NO, Bradykinin und Prostazyklin (Lüscher 1989; Saijonmaa, Ristimäki et al. 1990; Yokokawa, Kohno et al. 1993; Yokokawa, Tahara et al. 1993). ET-1 stimuliert über die ET_B-Rezeptoren die Bildung von NO aus Arginin (Hirata, Emori et al. 1993). Gleichzeitig aber hemmt NO die Bildung des muren Endothelins. Zusätzlich besteht eine komplexe Wechselwirkung zwischen Endothelin-1 und Prostazyklin. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ET-1 die Prostazyklin-Synthese stimuliert (Filep, Herman et al. 1991). (de Nucci, Thomas et al. 1988; Luscher, Yang et al. 1990). Interessanterweise moduliert ET-1 die Expression und Sekretion eigener Regulatoren, z.B. Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteine der extrazellulären Matrix und Fibronectin (Marini, Carpi et al. 1996; Hofman, Chen et al. 1998; Matsuura, Yamochi et al. 1998; Hafizi, Allen et al. 1999).

2.3.5. Endothelin-1-Rezeptor Blockade

In der Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz scheint Endothelin eine entscheidende Rolle zu übernehmen. So stimuliert ET-1 die Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II, erhöht die Syntheserate von Adrenalin und Aldosteron, und die Plasminogenaktivität steigt an (Boarder and Marriott 1989; Miller, Redfield et al. 1989; Cao and Banks 1990; Kawaguchi, Sawa et al. 1990). Welcher Nutzen ergibt sich daraus für die Klinik? Ist demnach der Einsatz von Endothelinrezeptorenblocker ein therapeutischer Ansatz zur Prävention von kardiovaskulären Ereignissen?

Es gibt die verschiedensten Peptide, die die Rezeptoren selektiv oder unselektiv blockieren können. Die Inhibition des ECE wird wohl alleine kaum einen Effekt zeigen, da die ECE-unabhängigen Wege über die Chymase und Non-ECE-Metalloprotease die Wirkung limitieren. Zudem besteht auch die Möglichkeit die ET-1 Produktion indirekt durch ACE-Hemmer und Statinen zu hemmen (Hernandez-Perera, Perez-Sala et al. 1998). Durch die Verabreichung des Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Bosentan konnte bereits eine Verbesserung der klinischen Situation der Patienten mit Pulmonalarterieller Hypertonie (PAH) erreicht werden (Apostolopoulou, Rammos et al. 2003). Die Ergebnisse für die Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz sind dagegen schlecht (Rich and McLaughlin 2003). In frühen Stadien der chronischen Herzinsuffizienz erhält ET-1 die Kontraktilität des erkrankten Myokards. ET_A-Rezeptor-Antagonisten verringern in dieser Phase die Kontraktilität und das klinische Krankheitsbild verschlechtert sich. Der Zeitpunkt der Behandlung ist von entscheidender Bedeutung, da die ET-Blockade beispielsweise die Narbenbildung des Herzmuskels beeinflusst. So kann die frühe Therapie die Narbenbildung unterstützen und zur linksventrikulären Dilatation und Dysfunktion führen (Nguyen, Cernacek et al. 1998).

Die Langzeitbehandlung mit ET_A-Rezeptor-Antagonisten reduzieren das Ausmaß der Arteriosklerose, ohne aber den Blutdruck und die Plasmacholesterinwerte zu senken. Zusätzlich wird die, durch NO vermittelte, vaskuläre Relaxation wiederhergestellt und die ET-1-Konzentration gesenkt (Barton, Haudenschild et al. 1998). Durch die ET_A/ET_B-Rezeptorblockade konnte bei bestimmten Patienten mit koronarer Sklerose eine Vasodilatation erreicht werden (Wenzel, Fleisch et al. 1998). Besondere Bedeutung hat das ET-System nach koronarer Intervention, z.B. PTCA. Hierbei konnten deutlich erhöhte ET-1-Spiegel erfasst werden, die für das Entstehen von Restenosen nach

erfolgreicher Angioplastie unter anderem verantwortlich gemacht werden (Douglas, Loudon et al. 1994). Durch konsequente Blockade der Rezeptoren konnte die Entwicklung der Neointima unterdrückt werden (Douglas, Vickery-Clark et al. 1995).

2.4. Angiotensin II

Angiotensin wird in einer vasoinktiven Vorstufe, dem Angiotensinogen, sowohl in der Leber als auch in Herz und Gefäßen gebildet. Durch die renal synthetisierte Peptidase, Renin, wird Angiotensinogen in Angiotensin I gespalten. Angiotensin I wird durch das ubiquitär vorkommende Angiotensin Converting Enzym (ACE) schließlich in die hochaktive Form, das Angiotensin II, überführt. Die Wirkung des Hormons wird über die Angiotensin II-Rezeptoren (AT1 und AT2) vermittelt (Miura, Saku et al. 2003).

2.4.1. Das Angiotensin-System

Angiotensin II ist der nach Endothelin-1 stärkste bekannte Vasokonstriktor. Am Herzen bewirkt es eine Erhöhung der Inotropie und des enddiastolischen Druckes (LVEDP). Durch die Wirkung des Hormons an der Niere wird einerseits der glomeruläre Filtrationsdruck gesteigert und andererseits über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System das intravasale Volumen durch vermehrte Rückresorption im proximalen Tubulus von Natrium und H₂O gesteigert. Zusätzlich stimuliert Angiotensin II die Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark und hat einen bedeutenden Einfluss auf die zerebrale Regulation von Durst und Natriurese.

Durch die mitogene Eigenschaft des Hormons nimmt es auch Einfluss auf das Wachstum insbesondere von glatten Muskelzellen der Gefäßwände und scheint eine entscheidende Rolle im Rahmen der Neoangiogenese zu spielen. Diese Wirkung wird zum einen durch Angiotensin II selbst, aber auch durch die Angiotensin-abhängige Stimulation von Wachstumsfaktoren wie PDGF, Thromboxan A₂ oder auch Endothelin-1 und durch die Stimulation der Protoonkogene c-fos und c-myc vermittelt (Lüscher 1994; Watanabe, Koba et al. 2002). Angiotensin II kann aber auch die Synthese von potentiellen Antagonisten wie Prostazyklin und NO stimulieren und über einen Rückkopplungsmechanismus die eigene Wirkung limitieren.

2.4.2. Die intrazelluläre Signaltransduktion und Beziehung zum Endothelin-1

Der intrazelluläre Effekt von Angiotensin II ist ähnlich der Wirkung von Endothelin-1. Durch die spezifische Bindung an Rezeptoren wird eine G-Protein gekoppelte Signaltransduktion bewirkt. Diese aktiviert die Phospholipase C. Durch die Bildung von Inositoltriphosphat und Diazylglyzerol wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht. Dieser Mechanismus bewirkt die Kontraktion der Muskelzelle. Dadurch wird der Synergismus beider Substanzen deutlich. Beide sind potente Vasokonstriktoren und haben mitogene Eigenschaften (Muller, Fiebeler et al. 2003).

So konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II die Endothelin-1-Synthese durch vermehrte Bildung von preproendothelin-1 mRNA stimuliert (Imai, Hirata et al. 1992). Beide Substanzen stimulieren die Synthese von Antagonisten wie Prostazyklin (de Nucci, Thomas et al. 1988).

Somit ist die Rolle beider Substanzen bei der Pathogenese der Arteriosklerose und damit verbundener kardiovaskulärer Erkrankungen bedeutsam.

2.5. Oxidativer Stress

“Normales Attribut des aeroben Lebens ist die strukturelle Schädigung einer Vielzahl von Verbindungen – DNA, Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden – durch Oxidation. Die oxidative Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies wird oxidativer Stress genannt.“
(Helmut Sies, 1986)

Die Energiegewinnung aus molekularem Sauerstoff (O_2) ist für den Menschen lebensnotwendig. Dabei können Sauerstoffradikale entstehen. Freie Radikale sind Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen. Ein ungepaartes Elektron belegt dabei ein Orbital allein. Sauerstoffradikale sind z.B.:

Superoxidanionradikal ($O_2\bullet$)
 Perhydroxylradikal ($HOO\bullet$)
 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
 Hydroxylradikal ($HO\bullet$)
 Aloxylradikal ($RO\bullet$)
 Peroxylradikal ($ROO\bullet$)
 Hydroperoxyd ($ROOH\bullet$)

Diese reaktiven Sauerstoffspezies können sowohl unter pathologischen als auch unter physiologischen Situationen entstehen. So werden Sauerstoffradikale z.B. im Zytoplasma als Nebenprodukt der Xanthinoxidasereaktion und in Mitochondrien als Nebenprodukt der Oxidation von H^+ in der Atmungskette generiert. Aus diesem Grunde war es in der Evolution notwendig, Schutzmechanismen zu etablieren, um den Organismus vor der radikalen und reaktionsfreudigen Wirkung der Sauerstoffradikale vor allem auf das genetische Material zu schützen. Alle aerob lebenden Zellen benutzen verschiedene enzymatische und nichtenzymatische Mechanismen. Zu den nichtenzymatischen Radikalscavengern gehören unter anderem α -Tocopherol, β -Carotin, Ascorbat, Glutathion und Harnsäure. Zu den Enzymen gehören Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase, Catalase und Hydroxyperoxidase. (Sies 1993). Normalerweise liegt zwischen den Prozessen ein Gleichgewicht vor. Wird dieses aber zugunsten der oxidativen Reaktionen verschoben, spricht man vom „Oxidativen

Stress“. Faktoren wie Nikotinabusus, Alkohol, ionisierende Strahlung, Ozon und einseitige, vitaminarme Ernährung können diese Reaktionen triggern.

Sauerstoffradikale sind sehr reaktionsfreudig und können den Organismus nachhaltig schädigen. So erhöhen Sauerstoffradikale die Inzidenz von Mutationen der DNA. Oxidative Veränderungen an der DNA können Strangbrüche, cross-link-Phänomene und Hydroxylierungen sein (Lesnefsky 1994). Ebenso scheinen Sauerstoffradikale eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus zu spielen (Katusic and Vanhoutte 1989; Gorch, Brandes et al. 2000; Trochu, Bouhour et al. 2000). Radikale sind in Lage Stickstoffmonoxid zu oxidieren und damit dessen vasodilatatorische Wirkung zu mindern, die Endothelin-1-Konzentration zu erhöhen und ihnen wird eine entscheidene Rolle bei der Entstehung der arteriellen Hypertonie zugeschrieben (Gryglewski, Palmer et al. 1986; Ding, Gonick et al. 2000; Kähler, Ewert et al. 2001; Kähler, Sill et al. 2002). Im Gegensatz dazu erfüllen diese Spezies aber auch positive Effekte für den Organismus. So benutzen Granulozyten Superoxidradikale zur Abwehr von Krankheitserregern (Ward, Till et al. 1983).

2.5.1. Bedeutung von oxidativen Stress

Sauerstoffradikale sind an kurzfristigen Reaktionen und langfristigen strukturellen Veränderungen des Gewebes beteiligt. Da die Bildung von reaktiven Spezies unter anderem vom Sauerstoffpartialdruck abhängig ist, kann es nach erfolgreicher Reperfusion von Koronararterien zum so genannten Reperfusionsschaden kommen. Der erhöhte Sauerstoffpartialdruck führt zur vermehrten Bildung von Radikalen, die ihrerseits Granulozyten aktivieren. Die lokale Entzündung kann dann zur Entwicklung der eigentlichen Myokardnekrose, durch Zerstörung von Myozyten, Endothelzellen und Zellkern-DNA, erheblich beitragen (Richard, Murry et al. 1990). So konnte unter Einsatz von Sauerstoffradikal-Scavengern die Ausdehnung des myokardialen Nekrosebezirkes reduziert werden (Carrea, Lesnefsky et al. 1991).

Freie Radikale wirken zytotoxisch. Sie können mit ungesättigten Fettsäuren von Membranphospholipiden reagieren und damit osmotische Hämostase und Rezeptorfunktion erheblich beeinträchtigen (Richard, Murry et al. 1990). Zudem können sie die Transkription immunogener und proinflammatorischer Mediatoren, wie IL-1, TNF- α und γ -Interferon aktivieren und damit eine lokale und systemische Entzündung verursachen und unterhalten (Moslen 1994; Pentland 1994).

Etablierte Risikofaktoren der Arteriosklerose, wie Hypertonie, Nikotinabusus, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus, stehen im engen Zusammenhang zum oxidativen Stress der Gefäßwände, ausgelöst durch freie Radikale. Durch oxidative Alteration der LDL-Partikel erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass diese in der Arterienwand abgelagert werden. Desweiteren wird die vasodilatatorische Wirkung des EDRF (NO) vermindert und die Endothelzellen toxisch verändert (Gryglewski, Palmer et al. 1986; Maxwell 2000). Viele Studien haben den protektiven Effekt der Antioxidantien, wie Vitamin E und C, demonstriert. Leider haben aber prospektive, randomisierte, kontrollierte Studien (z.B. CHAOS, HOPE) diesen Effekt nicht auf die Verringerung kardiovaskuläre Mortalität übertragen können.

2.5.2 Interaktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Endothelin-1

In früheren Studien konnte eine Verbindung zwischen Ischämie und erhöhten Endothelin-1-Level belegt werden (Douglas, Louden et al. 1994; Hassan, Kashimura et al. 1997). Aber nicht nur Ischämie begünstigt das Auftreten erhöhter Sauerstoffradikalkonzentrationen, sondern sowohl Hypertonie als auch Hypercholesterinämie zeigten gleiche Ergebnisse (Ohara, Peterson et al. 1993; Pettit, Wong et al. 2002). Zusätzlich gelang der Nachweis, dass Endothelzellen und VSMC in vitro unter oxidativem Stress deutlich erhöhte Level an Endothelin-1 aufweisen (Kähler, Mendel et al. 2000; Kähler, Ewert et al. 2001; Kähler, Sill et al. 2002).

Endothelin-1 und reaktive Oxygenspezies begünstigen durch das mitogene und proliferationsinduzierende Potential die Entstehung und Progression atherosklerotischer Areale. Da Sauerstoffradikale nicht nur die Endothelin-1-Synthese stimulieren, sondern auch vasokonstriktorisches sehr effektiv wirksam sind, bilden sie mit Endothelin-1 potentielle Agonisten. Endotheline sind lang anhaltende Vasokonstriktoren und können möglicherweise den Effekt der Radikale daher nachhaltig unterstützen (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988).

3. Material und Methoden

3.1. Gewinnung von Arteria mammaria interna Segmenten

Insgesamt wurden 14 Arteria mammaria interna für die Versuche benutzt. 6 Arterien wurden für die Methodenwahl des Einfrierens genutzt. Die übrigen Präparate wurden in zwei Probengruppen eingeteilt. Probegruppe A bestand aus 5 Arterien, die mit Xanthin-Oxidase inkubiert und anschließend für die semiquantitative Auswertung histologisch aufarbeitet wurden. Probegruppe B bestand aus drei Arterien, die mit Angiotensin II inkubiert wurden. Hier erfolgte die quantitative Bestimmung der Endothelin-1-Konzentration mittels ELISA.

3.1.1. Probegruppen

Tabelle 1 Probegruppe A

Diese Gruppe umfasst 5 Arterien, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Xanthin-Oxidase inkubiert wurden.

Probennummer	Inkubation mit Xanthin-Oxidase
A 1	5 U/l 10 U/l 10 U/l + SOD + Cat
A 2	Kontrolle 5 U/l 10 U/l
A 3	Kontrolle 10 U/l 10 U/l + SOD + Cat
A 4	Kontrolle 5 U/l
A 5	Kontrolle 10 U/l 10 U/l + SOD + Cat

Tabelle 2 Probegruppe B

Diese Präparate (B1-3) wurden jeweils mit 10^{-5} mol/l Angiotensin II inkubiert und anschließend für 8h bzw. 12h in PBS weiter inkubiert.

Probennummer	Inkubation mit 10^{-5} mol/l Angiotensin II	
B 1 - 3	4h	Kontrolle 4h
	4h + 8h in PBS	Ko. 4h + 8h in PBS
	4h + 12h in PBS	Ko. 4h + 12h in PBS

3.1.2. Vorbereiten des Transportmediums

Für den Transport und für die Lagerung der Arterien wurde der HEPES-Puffer gewählt. Dieser wurde immer frisch angesetzt und auf 4°C gekühlt verwendet. Zur Herstellung des Mediums wurde das Schema, wie im Anhang „Verwendete Lösungen“/ S. 38 beschrieben, benutzt.

3.1.3. Beschaffung aus dem Herz-OP

Es wurden humane Arteria mammaria interna für die Versuche benutzt. Diese wurden freundlicherweise von der Herzchirurgischen-Abteilung unter Prof. Dr. Hermann Reichenspurner überlassen.

Durch die gute Zusammenarbeit war es möglich, die Gefäßstücke direkt aus dem Herz-OP abzuholen. Die Zeit von der Übergabe bis zur Verarbeitung in unserem Labor lag zwischen 10 und 15 min. Als Organspender wurden Patienten ausgewählt, bei denen aufgrund einer koronaren Herzerkrankung die Indikation zur chirurgisch Myokardrevaskularisierung bestand (Genehmigung der Ethikkommission Hamburg: OB/ II/ 2000, vom 25.02.2000). Die sowohl weiblichen als auch männlichen Spender, im Alter von 62 bis 93 Jahren, hatten unterschiedliche kardiale Risikofaktoren.

3.1.4. Präparation der Segmente

Die Präparate wurden sofort nach Erhalt in einer mit 4°C HEPES-Lösung gefüllten Petrischale (150350, Fa. Nunclon Surface) mit einer Mikro-Schere (FM010R N.Mueller 120 mm, Fa. AESCULAP®) und einer Mikropinzette (FM001R Mueller 110 mm, Fa.

AESCULAP®) unter einem Mikroskop (Hund-Wetzlar, s. Abbildung 3, 4) bei 10-facher Vergrößerung von paravasalem Fett und Adventitia befreit. Bei der Präparation wurde auf die Unversehrtheit besonders der Intima und Media geachtet. Anschließend wurde das Präparat mit einem Skalpell (Cutfix® Surgical Disposable Scapel, 5518059, Fa. Braun) in gleich große Stücke geteilt. Während der Prozedur musste die Arterie stets feucht gehalten werden.



Abbildung 3 Vorrichtung zur Präparation der Arterie

Abgebildet sind das Mikroskop (Hund-Wetzlar) und eine Präparationslampe.



Abbildung 4 Präparation einer Arterie

Präparation der Arteria mammaria interna in einer Petrischale, die mit 4°C kaltem Hapes-Puffer gefüllt ist. Das Gefäß wird von paravasalem Fett und Adventitia befreit. Dabei muss die Arterie stets feucht gehalten werden.

3.2. Inkubation für die histologische Auswertung

3.2.1. Vorbereiten der Inkubation

Für die Inkubation wurde ein Wasserbad (s. Abbildung 5) vorbereitet und auf 37°C vorgewärmt. Um die kontinuierliche O₂-Insufflation (s. Abbildung 8) während des Versuches zu gewährleisten, wurde Carbogen (GA 619, Linde AG), ein Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂, in einer 10l Druckflasche (s. Abbildung 6) benutzt. Über Plastikleitungen (R 3603, Fa. Tygon®), die am Ende mit einer 200µl Pipette (741065, Fa. Greiner) bestückt waren, wurde das Sauerstoffgemisch in die Inkubationsröhrchen geleitet. Das Wasserbad wurde auf leichten Schüttelmodus eingestellt.



Abbildung 5 Wasserbad für die Inkubation

Für die Versuche wurde ein leichter Schüttelmodus bei 37°C gewählt.



Abbildung 6 Druckgasflasche mit Carbogen

Abgebildet ist eine 10l Druckflasche mit Carbogen (Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂).

3.2.2. Herstellen der Inkubationslösungen

3.2.2.1. Benötigte Materialien

Falcon-Tubes 50ml (352070, Fa. BECTON/DICKINSON), Falcon Tubes 15ml (352096, Fa. BECTON/DICKINSON), Carbogen (GA 619, Linde AG), HEPES-Puffer, Xanthin-Oxidase (X-1875, Fa. SIGMA), Xanthin (X-0626, Fa. SIGMA), SOD (S-5639, Fa. SIGMA), Catalase (C-3556, Fa. SIGMA), HCl 1n (1.09057.1000, Fa. Merck), NaOH 1n (1.09137.1000, Fa. Merck), aqua dest. (001428, Fa. Baxter)

3.2.2.2. Herstellen einer 0,1 molaren Xanthin-Lösung

- 300mg Xanthin auf Präzisionswaage abwiegen (s. Abbildung 7)
- 15ml aqua dest. und 2ml NaOH 1n
in ein Falcon geben
- auf 60°C erwärmen
- Xanthinpulver löst sich nach ca. 15-20 min
- auf 20ml mit aqua dest. auffüllen



Abbildung 7 Präzisionswaage (Kern 372)

3.2.2.3. Inkubationsmedium mit Xanthin-Oxidase

- in die Kontrolle 30ml HEPES-Puffer
- in Falcons für Inkubation mit oxidativem Stress 20ml HEPES pipettieren
- 300µl Xanthin (1mmol/l)
- 30µl HCl 1n
- Xantin-Oxidase 5U/l und 10U/l in die entsprechenden Falcons
- auf 30ml mit HEPES-Puffer auffüllen

3.2.2.4. Inkubationsmedium mit Xanthin-Oxidase + SOD + Catalase

- in die Kontrolle 30ml HEPES-Puffer
- in Falcons für Inkubation mit oxidativem Stress 20ml HEPES
- 300µl Xanthin (1mmol/l)
- 30µl HCl 1n
- 5U/l und 10U/l Xantin-Oxidase in die entsprechenden Falcons
- zusätzlich ein Falcon mit 10 U/l Xanthin-Oxidase + SOD 300U/ml + Catalase 375U/ml
- auf 30ml mit HEPES-Puffer auffüllen

3.2.3. Durchführung der Inkubation

Die Gefäße wurden wie oben beschrieben in die entsprechenden Inkubationsmedien gegeben und für 6h im Wasserbad bei 37°C und leichtem Schwenken inkubiert. Während dieser Zeit wurde ständig O₂ unter leichter Blasenbildung insuffliert (s. Abbildung 8).



Abbildung 8 Inkubationsanordnung

Über die Plastikleitungen wurde O₂ insuffliert. Dabei wurde der Flow so eingestellt, dass eine leichte Blasenbildung auftrat.

3.3. Inkubation für die Auswertung mittels ELISA

3.3.1. Benötigte Materialien

Falcon-Tubes 50ml (352070, Fa. BECTON/DICKINSON), Falcon Tubes 15ml (352096, Fa. BECTON/DICKINSON), Carbogen (GA 619, Linde AG), HEPES-Puffer, Angiotensin II (A- 9525, Fa. SIGMA)

3.3.2. Inkubationsmedium mit Angiotensin II

- in die Kontrolle 30ml HEPES-Puffer
- 10⁻⁵mol/l Angiotensin II in die Versuchsröhrchen
- auf 30ml mit HEPES-Puffer auffüllen

3.3.3. Durchführung der Inkubation

Die Gefäße wurden in die vorbereiteten Tubes zur Inkubation gegeben. In einem leichten Schüttelmodus wurden die Arterien für 4h bei 37°C inkubiert und dabei kontinuierlich mit O₂ aus Carbogen insuffliert. Anschließend wurden alle Gefäße in PBS gespült. Ein Gefäß wurde dann für die Messung mittels ELISA aufbereitet. Die anderen beiden wurden dann für 8h bzw. 20h in PBS bei 37°C weiter inkubiert und anschließend ebenfalls für die quantitative Messung vorbereitet.

3.4. Präparation der Proben und Kontrollen für die histologische Aufarbeitung

3.4.1. Herstellen von Kryoschnitten

3.4.1.1. Benötigtes Material

N-Hexan (1.04367.1000, Fa. Merck), flüssiger Stickstoff, Kanüle (0,90 x 40mm, 4657519, Fa. Braun Melsungen AG), Korkplatte, Einbettmedium (Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] Compound, 0206710005, Fa. SAKURA), Kryotom (Frigocut, Fa. Reichert & Jung, Abbildung 3/5) und Objektträger SuperFrost[®] Plus (041300, Fa. Menzel-Gläser[®]), weiße Pappbecher.

3.4.1.2. Herstellen von Kryoblöcken durch verschiedene Einfriermethoden

Um den Erhalt der morphologischen Integrität nach dem Einfrieren zu wahren, wurden verschiedene Methoden untersucht. Entscheidende Kriterien dafür waren:

- ein von der Membrana elastica interna nicht abgelöstes Epithel
- keine versprenkelten Zellkerne im Bereich des Epithels und des Gefäßlumens.

Als Präparate dienten dafür sowohl Kaninchenaorten und –femoralarterien als auch humane Arteriae mammae.

Es standen drei verschiedene Methoden zur Auswahl. Die so gewonnen Kryoblöcke wurden bis zur Weiterverarbeitung im - 80°C Kühlschrank gelagert.

I. Kühlen von n-Hexan in flüssigem Stickstoff

Der flüssige Stickstoff wurde in weiße Plastikbecher gegeben. Ein Falconröhrchen wurde dann mit 30ml n-Hexan befüllt und im flüssigen Stickstoff gekühlt, bis das Röhrchen leicht beschlagen war. Nun wurde vorsichtig mit einer anatomischen Pinzette das Gefäßstück aus dem Inkubationsmedium entnommen. Vorsichtig wurde das Präparat gegen eine Kanüle gelehnt. Diese Kanüle wurde vorher in eine 0,5 x 0,5 cm große Korkplatte gesteckt. Das Gefäß wurde dann in Tissue-Tek[®] eingebettet. Anschließend wurde zunächst das Präparat in das gekühlte n-Hexan für 2min gehalten. Das Einbettmedium färbte sich dabei weiß und wurde dann in flüssigen Stickstoff überführt.

II. Kühlen von n-Hexan auf 4°C

N-Hexan wurde auf 4°C gekühlt. Das Präparat wurde eingebettet in Tissue-Tek[®] 2min in das gekühlte n-Hexan gehalten und anschließend in flüssigem Stickstoff überführt.

III. Einfrieren direkt im flüssigen Stickstoff

Das Gefäß wurde eingebettet in Tissue-Tek[®] direkt in flüssigen Stickstoff für 2min getaucht und dort aufbewahrt.

3.4.1.3. Schneiden der Kryoblöcke

Von den einzelnen Präparaten wurden jeweils 12 Gefrierschnitte angefertigt. Das Kryotom (s. Abbildung 9) wurde dabei auf -20°C gekühlt. Um ein Auftauen zu verhindern, wurden die Kryoblöcke mit Hilfe von Trockeneis und einem Thermogefäß vom - 80°C Kühlschrank zum Kryotom transportiert. Die Schnittdicke betrug 5µm. Die so gewonnenen Schnitte wurden paarweise auf Objektträger übertragen.



Abbildung 9 Kryotom

Anfertigung von 5µm dicken Schnitten. Die Temperatur wurde dafür auf -20°C eingestellt.

3.4.2. Einfrieren und Lagern im -80 °C Kühlschrank

Die Schnitte wurden luftgetrocknet und in Kryoboxen für Objektträger gesteckt und bis zur endgültigen Färbung im - 80°C Kühlschrank gelagert.

3.5. Histologische Aufarbeitung

3.5.1. Hämalan-Färbung

3.5.1.1. Benötigte Materialien

Azeton (14100, Fa. Merck), DAKO-Pen (S-2002, Fa. DAKO), Lösung A (Verwendete Lösungen/ S.39), Meyer's Hämalan (1:2 mit aqua dest. verdünnt), Faramount Aqueous Mountening Medium (S-3025, Fa. DAKO) und große Deckgläser (24 x 60mm, Fa. Marienfeld).

3.5.1.2. Durchführung der Färbung

- Schnitte 5-10min an der Luft trocknen lassen
- 5min in Azeton (-20°C) fixieren
- 30min trocknen lassen
- jeden Schnitt mit DAKO-Pen einkreisen und 1min trocknen lassen
- 15min in Lösung A rehydrieren
- 30s in Küvette mit Meyer's Hämalan
- Schnitte in Küvette mit Leitungswasser überführen
- 3min vorsichtig mit Leitungswasser spülen
- Eindeckeln mit Faramount Einbettungsmedium und große Deckgläser

3.5.2. Peroxidase-Färbung

3.5.2.1. Benötigte Materialien

Azeton (14100, Fa. Merck), DAKO-Pen (S-2002, Fa. DAKO), Lösung A (s. verwendete Substanzen), primärer Antikörper (Rabbit Anti-Endothelin-1 (Porcine, Human) Serum, Fa. Peninsula Laboratories, INC. CA, USA), sekundärer Antikörper (Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG, 711-035-152, Dianova), Natrium-Azetat (1.06268.0250, Fa. Merck), AEC-Stammlösung (AEC-Tabletten (A-6926, Fa. SIGMA) + 5ml Dimethylformamid (D-4254, Fa. SIGMA)), H₂O₂ (1.07209.0250, Fa. Merck), EDTA (E-6758, Fa. SIGMA), Faramount Aqueous Mountening Medium (S-3025, Fa. DAKO) und große Deckgläser.

3.5.2.2. Durchführung der Färbung

- Schnitte 5-10min an der Luft trocknen lassen
- 5min im eiskalten Azeton (-20°C) fixieren
- 30min trocknen lassen
- jeden Schnitt mit DAKO-Pen einkreisen und 1min trocknen lassen
- 15min in Lösung A rehydrieren
- Schnitte in feuchter Kammer inkubieren
- primärer Antikörper (Verdünnung 1:200) 2h bei RT, je Schnitt 50µl
- Waschen 3-mal je 5min in Lösung A
- sekundärer Antikörper (Verdünnung 1:500) 1h bei RT, je Schnitt 50µl
- Waschen 3-mal je 5min in Lösung A
- kurz in Stechküvette mit Natrium-Azetat
- Färbelösung ansetzen: Natrium-Azetat 10ml + AEC Stammlösung 500µl + H₂O₂ 2µl
- 6min in dunkler feuchter Kammer mit 50µl Färbelösung inkubieren
- Stoppen mit EDTA
- in Lösung A überführen
- Eindeckeln mit Faramount Einbettungsmedium und große Deckgläser

3.5.3. ABC-AP-Färbung

3.5.3.1. Benötigte Materialien

Azeton (14100, Fa. Merck), DAKO-Pen (S-2002, Fa. DAKO), TBS-Puffer (Verwendete Lösungen/ S. 39), 100mmol Tris-HCl pH 8,2 (Verwendete Lösungen/ S. 39), BSA (A 3059, Fa. SIGMA), Primär-Antikörper (Rabbit Anti-Endothelin-1 (Porcine, Human) Serum, Peninsula Laboratories, INC. CA, USA), Vectastain[®] ABC-AP Kit (AK-5000, Fa. Vector Laboratories), Sekundär-Antikörper (Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) made in Goat (BA-1000, Fa. Vector Laboratories, INC.CA,USA)), Vector[®] Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I (SK-5100, Fa. Vector Laboratories), Levamisole (SP-5000, Fa. Vector Laboratories), kleine Deckgläser, Mowiol[®] 4-88 (475904, Fa. Calbiochem), 1,2-Phenylenediamine (1.07243.0050, Fa. Merck).

3.5.3.2. Durchführung der Färbung

- Schnitte auftauen und 30min trocknen lassen
- Fixieren in Azeton 4 °C für 10min
- Lufttrocknen lassen
- mit DAKO-Pen umranden und kurz trocknen lassen
- 5min in TBS rehydrieren
- BSA 5% für 20min
- Primär-Antikörper (Verdünnung 1:500) für 1h bei RT, 75µl
- 3-mal Waschen in TBS
- Sekundär-Antikörper (1:400) 30min bei RT, 75µl
- 3-mal Waschen in TBS
- Inkubation 30min mit ABC-Vector Red Complex
- 1-mal Waschen in TBS
- 5min in 100mmol Tris-HCl
- Vector Red Substrat für 4min im Dunkeln inkubieren
- Reaktion in H₂O stoppen
- Eindeckeln in Mowiol und 1,2-Phenylenediamine, kleine Deckgläser

3.5.4. CyTM-Färbung

3.5.4.1. Benötigte Materialien

PBS (Verwendete Lösungen/ S. 39), Azeton (14100, Fa. Merck), Glycin (3908.2, Fa. Carl Roth), BSA (A 3059, Fa. SIGMA), Primär-Antikörper (Rabbit Anti-Endothelin-1(Porcine, Human) Serum, Peninsula Laboratories, INC. CA, USA), Sekundär-Antikörper (CyTM2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), 111-225-144, Dianova), kleine Deckgläser, Mowiol[®] 4-88(475904, Calbiochem).

3.5.4.2. Durchführung der Färbung

- Schnitte auftauen und trocknen
- in PBS waschen
- 1,5min in PBS
- 1,5min in Azeton/ PBS (50:50)
- 1,5min in Azeton
- 3min in Azeton (-20°C) fixieren

- Objektträger trocknen lassen
- Rehydrieren durch 3-mal Waschen in PBS/ 0,5% Glycin
- 30min Blocken mit 5% BSA, 100µl pro Schnitt
- Primär-Antikörper (Verdünnung 1:200) 60min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren, je Schnitt 100µl
- 3-mal für 5min Waschen in PBS/ Glycin
- Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:200) 60min bei 37°C, je Schnitt 100µl
- 3-mal für 5min in PBS Waschen
- Eindeckeln mit Mowiol und kleine Deckgläsern

3.5.5. α -Smooth Muscle Actin-Färbung

3.5.5.1. Benötigte Materialien

PBS (Verwendete Lösungen/ S. 39), Azeton (14100, Fa. Merck), Glycin (3908.2, Fa. Carl Roth), BSA (A 3059, Fa. SIGMA), Primär-Antikörper (monoclonal Mouse anti Human α -Smooth Muscle Actin antibody IgG_{2a/ κ} (06519, Dianova)), Sekundär-Antikörper (CyTM2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 115-255-166, Dianova), kleine Deckgläser, Mowiol[®] 4-88 (475904, Calbiochem).

3.5.5.2. Durchführung der Färbung

- Schnitte auftauen und trocknen
- in PBS waschen
- 1,5min in PBS
- 1,5min in Azeton/ PBS (50:50)
- 1,5min in Azeton
- 3min in Azeton (-20°C) fixieren
- Objektträger trocknen lassen
- Rehydrieren durch 3-mal Waschen in PBS/ 0,5% Glycin
- 30min Blocken mit 5% BSA, 100µl pro Schnitt
- Primär-Antikörper (Verdünnung: 1:200) 30min bei RT in feuchter Kammer inkubieren, je Schnitt 100µl
- 3-mal für 5min Waschen in PBS/ Glycin
- Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:200) 60 min bei 37°C, je Schnitt 100µl

- 3-mal für 5min in PBS Waschen
- Eindeckeln mit Mowiol und kleinen Deckgläsern

3.6 Semiquantitative Bestimmung des Big-Endothelins mittels CyTM-Färbung

3.6.1. Mikroskopie

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Mikroskop (Leica) bei 200x Vergrößerung betrachtet. Der Sekundär-Antikörper leuchtete grün bei der Verwendung des Grünfilters (Nummer: 3).

3.6.2. Fotodokumentation

Für die Aufnahme der Bilder wurde die Kamera Q-Imaging, Retiga 1300 benutzt. Mit Hilfe des Kameraprogrammes IPLap Alias konnten dann standardisierte Aufnahmen von den Schnitten gemacht werden.

Einstellungen des Programms:

Camera	Exposure	Merge Color Channel
Single Exposure	1200 s	Merge Channel RGB

3.6.3. Bestimmung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität

Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität, als Surrogatparameter für die Intensität der Fluoreszenz, wurde mit Hilfe von Adobe Photoshop CS (Version 8.0.1.) ermittelt. Ein Auswahlbereich von stets 900 Pixel wurde über das Endothel gelegt und somit der Mittelwert der grünen Fluoreszenz gemessen. Dieser Wert wurde 6-mal an verschiedenen Stellen des Endothels für jeden Schnitt ermittelt und anschließend daraus der Mittelwert gebildet.

3.7. ELISA

3.7.1. Benötigte Materialien und Geräte

Big-Endothelin ELISA Kit (BI-20072, Fa. Biomedica Gruppe Wien), Multichannel-Pipette für 50 – 300µl (Finnpipette[®] H50168, Labsystems), Pipettenspitzen (741065, Fa. Greiner), Mikrotiterplattenphotometer (SLT Spectra, Fa. Labinstruments) mit 450nm Filter (620 nm Referenz), Software für Messung (Easy-Fit, Version 7.17), Schüttelinkubator 37°C (Th 15, Edmund Bühler), Vortexer (VF2, Fa. Janke & Kunkel

IKA[®]-Labortechnik), Schale für Waschpuffer (4870, Fa. Corning Incorporated), Multipette (Multipette[®] plus, Fa. Eppendorf) Pipettenspitzen (Fa. Eppendorf), Lichtundurchlässige Abdeckung für Dunkelreaktion, Zentrifuge (Rotina 35R, Fa. Hettich Zentrifugen), Coulter Mixer (Fa. Coulter Electronics Limited), PBS (Verwendete Lösungen/ S. 39).

3.7.2. Vorbereitung der Proben

Für die Bestimmung des intrazellulären Endothelin-1-Proteins wurden die Gefäße nach Ablauf der Inkubation homogenisiert. Vor der Homogenisation (s. Abbildung 10) wurden die Segmente einzeln mit einer Präzisionswaage gewogen, um später eine genaue Aussage über die Endothelin Konzentration, bezogen auf die Masse machen zu können. Die Arterie wurde in 300µl PBS standardisiert für 2min bei Stufe 2 homogenisiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert. Die Konzentration des synthetischen Endothelin-1 unter Inkubation mit reaktiven Sauerstoffspezies wurde mittels ELISA quantifiziert. Es wurde der Big Endothelin ELISA (BI-20072, Fa. Biomedica Gruppe Wien) verwendet. Big-ET wird erst etwa nach einer Stunde auf die Hälfte seiner Konzentration abgebaut. ET hingegen hat eine Halbwertszeit von weniger als einer Minute, deshalb wurde das Big-ET gemessen und das Protokoll Ab mit dem Messbereich von 0,025 – 6,25fmol/ mg und der höheren Sensitivität gewählt.



Abbildung 10 Homogenisator

3.7.3. Prinzip des Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)

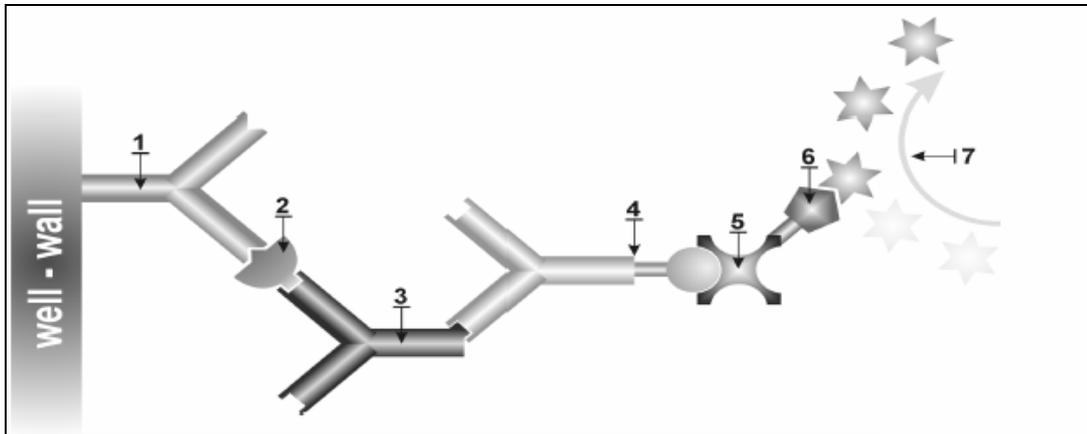


Abbildung 11 Prinzip ELISA (Quelle: Fa. Biomedica)

Dargestellt ist das biochemische Prinzip des Big-Endothelin-ELISA. Die entsprechenden Antikörper und Reagenzien sind nummeriert. (1) monoklonaler anti Big-Endothelin-Antikörper, (2) Probe, (3) monoklonaler anti Big-Endothelin-Antikörper, (4) Konjugat, (5) Substrat, (6) Stopplösung, (7) enzymkatalysierter Farbumschlag

Das Prinzip des Endothelin-ELISA beruht auf einer Sandwich Technik.

Die Mikrotiterplatte ist mit einem polyclonalen anti Big- Endothelin-1- Antikörper beschichtet. Dieser polyclonale Antikörper bindet an dem C-terminalen Ende (AS 22-38) der Big-ET Region und ist spezifisch für Big Endothelin (1-38).

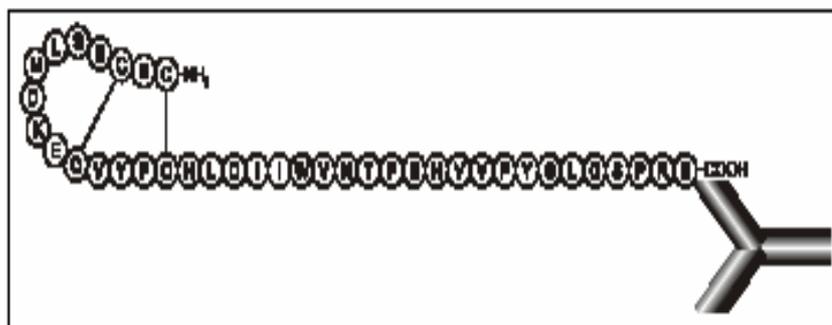


Abbildung 12 Big-Endothelin & anti Big-Endothelin-Antikörper (Quelle: Fa. Biomedica)

3.7.4. Versuchsdurchführung

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die Proben wurden für 10min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Standards und Kontrolle wurden jeweils in 1ml PBS und den monoclonalen Antikörper in 5,5ml PBS gelöst. Diese wurden bei Raumtemperatur für etwa 30min auf dem Rollmischer gut gemischt und der mitgelieferte Waschpuffer auf 1:10 verdünnt. Dann wurden jeweils 100µl Standard/ Probe/ Kontrolle in die Mikrotiterstreifen pipetiert; hinzu kamen 50µl Antikörper mit Ausnahme des Leerwertes. Die Streifen wurden abgedeckt und für 3 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Inhalte der Wells verworfen und fünfmal mit 300µl Waschpuffer gewaschen. Nachdem letztem Waschschrift wurden die Reste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Anschließend wurde 200µl Konjugat in alle Wells pipetiert. Wiederum wurden alle Wells mit einem Streifen abgedeckt und die Platte für 1 Stunde bei 37°C in einen Schüttelinkubator gegeben. Es schlossen sich erneut fünfmalige Waschschriffe an (s.o.).

Nun folgte das Pipettieren von 200µl Substrat in alle Wells und Inkubieren für 30min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln. Jetzt folgte die Zugabe von jeweils 50µl Stopplösung in alle Wells und eine gute Durchmischung.

3.7.5. Messung der Extinktion und Erzeugen der Kalibrationsgeraden

Die Extinktion wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Als Referenz diente eine Messung, bei der eine Wellenlänge von 620nm verwendet wurde. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm MATLAB. Aus den gemessenen Standards wurde eine Kalibrationsgerade ermittelt, welche für jeden Versuch neu erstellt wurden. Diese Gerade hatte eine Korrelation im Bereich von 0,956 bis 0,998. Mit Hilfe dieser Geraden konnten dann die Konzentrationen für Big-Endothelin in fmol errechnet werden. Anschließend wurden die Konzentrationen durch die Massen der einzelnen Gefäße in mg dividiert.

3.8. Verwendete Lösungen

<u>Reagenz</u>	<u>Molekulargewicht</u>	<u>Masse</u>
<u>1. HEPES-Puffer</u>		
• NaCl	58,44g/mol	5,782g
• KCl	74,56g/mol	0,35g
• CaCl ₂	147,02g/mol	0,366g
• MgSO ₄	246,48g/mol	0,296g
• NaHCO ₃	84,01g/mol	2,1g
• K ₂ HPO ₄	228,23g/mol	0,14g
• HEPES	238,8g/mol	5,206g
• D(+) – Glucose – Monohydrate (C ₆ H ₁₂ O ₆ * H ₂ O)	198,17g/mol	2,2g
• in 1000 ml aqua dest. gelöst		
• → pH 7,35		
<u>2. PBS</u>		
• NaCl	58,44g/mol	8g
• KCl	74,56g/mol	0,2g
• KH ₂ PO ₄	136,09g/mol	0,2g
• Na ₂ HPO ₄	177,99g/mol	0,763g
• auf 1000 ml mit aqua dest. auffüllen		
• → pH 7,6		
<u>3. TBS</u>		
• Tris-Base	121,14g/mol	6,1g
• HCl 1n		37ml
• NaCl	58,44g/mol	18,8g
• Tween-20	0,1%	1ml
• → pH 7,6		
<u>4. Lösung A</u>		
• in 1000ml PBS		
• Gelantine	1%	20ml
• TWEEN-20	1:2	1ml

3.9. Verwendete Chemikalien

NaCl	(0278, Fa. Mallinckrodt Baker B.V)
KCl	(1.04936.0500, Fa. Merck)
CaCl ₂	(1.02382.1000, Fa. Merck)
MgSO ₄	(1.05886.0500, Fa. Merck)
NaHCO ₃	(1.06329.1000, Fa. Merck)
K ₂ HPO ₄	(1.05099.0250, Fa. Merck)
HEPES	(H-3375, Fa. SIGMA)
D(+)-Glucose-Monohydrate	(1.08342.1000, Fa. Merck)
Na ₂ HPO ₄	(1.06580.1000, Fa. Merck)
Gelantine	(G-6144, Fa. SIGMA)
Tween	(P-5927, Fa. SIGMA)
Tris-Base	(15504-020, Fa. GibcoBRL [®])

4. Ergebnisse

4.1. Verschiedene Einfriermethoden

4.1.1. Kühlen von n-Hexan in flüssigem Stickstoff

Kühlen von n-Hexan in flüssigem Stickstoff zeigte nach abschließender Hämalaun-Färbung (s. Abbildungen 13 bis 16) die besten Ergebnisse für die Erhaltung des Gewebes. Das Endothel, erkennbar durch die Kernfärbung, war nicht von der Membrana elastica interna abgelöst und es zeigten sich vereinzelt versprengte Zellkerne im Bereich des Arterienlumens.

Außerdem konnte die gleiche Qualität der Gewebeerhaltung bei den verschiedenen Inkubationen erreicht werden. Deshalb wurde für die histologische Aufarbeitung diese Methode in den folgenden Versuchen benutzt.

4.1.2. Kühlen von n-Hexan auf 4°C

Durch das Kühlen von n-Hexan auf 4°C ließen sich die Gefäße gut einfrieren. Beim anschließenden Schneiden stellte sich heraus, dass der Kryoblock nicht die notwendige Festigkeit zum Schneiden von 5µm Schnitten hatte. Während des Schneidevorgangs wurde der Block brüchig. So konnte die erforderliche Schnittdicke von 5µm nicht mehr gewährleistet werden. Da die Schnitte dann unregelmäßig dick geschnitten wurden, konnte diese dann für die histologische Aufarbeitung nicht genutzt werden.

4.1.3. Einfrieren direkt im flüssigen Stickstoff

Das direkte Einfrieren der Gefäße in flüssigen Stickstoff stellte sich als die aggressivste Methode heraus. Das Schneiden der Kryoblocke war sehr gut möglich. Bei der Kontrolle mit Hilfe der Hämalaun-Färbung zeigte sich, dass ein stark verändertes Gewebe vorlag. Das Endothel war an vielen Stellen von der Membrana elastica interna abgelöst und hatte seine Kontinuität verloren. Es waren reichlich bläulich gefärbte Zellkerne im Bereich des Lumens zu sehen. Da die Integrität vor allem des Endothels für die selektive Darstellung des Big-Endothelins von entscheidender Bedeutung ist, wurde diese Methode verlassen.

4.2. Ergebnisse der Histologie

4.2.1. Hämalaun-Färbung

Die Hämalaun-Färbung wurde als die gebräuchlichste Übersichtsfärbung zur Beurteilung des Gewebes, vor allem des Endothels, verwendet. Hämatoxylin ist bei niedrigem pH-Wert ein positiv geladener Farbstoff und kann daher negativ geladene („basophile“) Strukturen (z.B. DNA des Kernchromatins) blau färben. Hämalaun ist die Zubereitung von Hämatoxylin und Aluminiumlack. Die Abbildungen 13 bis 16 zeigen Beispiele für diese Färbung und demonstrieren erhaltenes Gewebe.

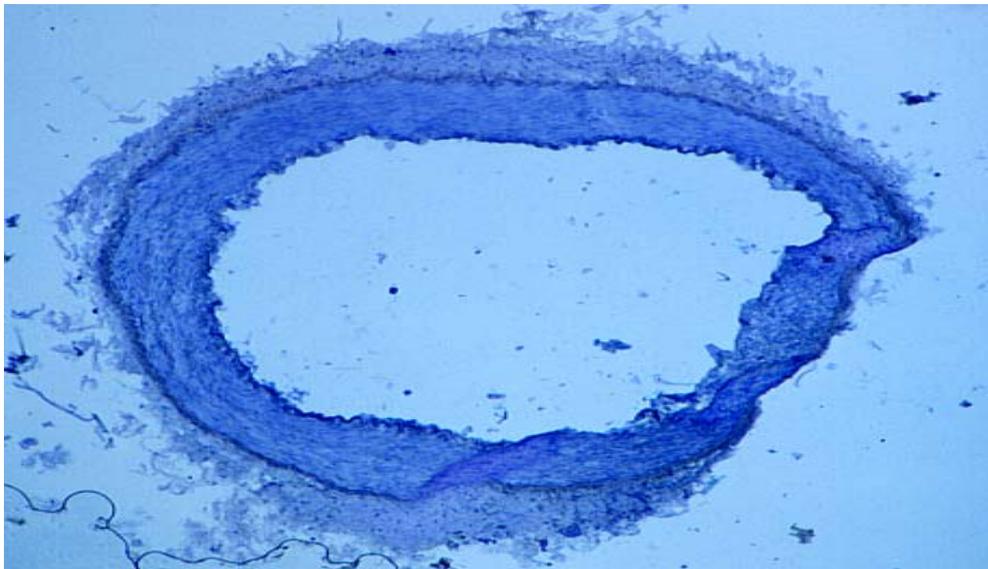


Abbildung 13 Kontrollgefäß (40x) Das Bild zeigt eine Arterie im Querschnitt. Das Endothel ist nicht abgehoben oder zerstört. Gut erkennbar die Schichtung der Wand.

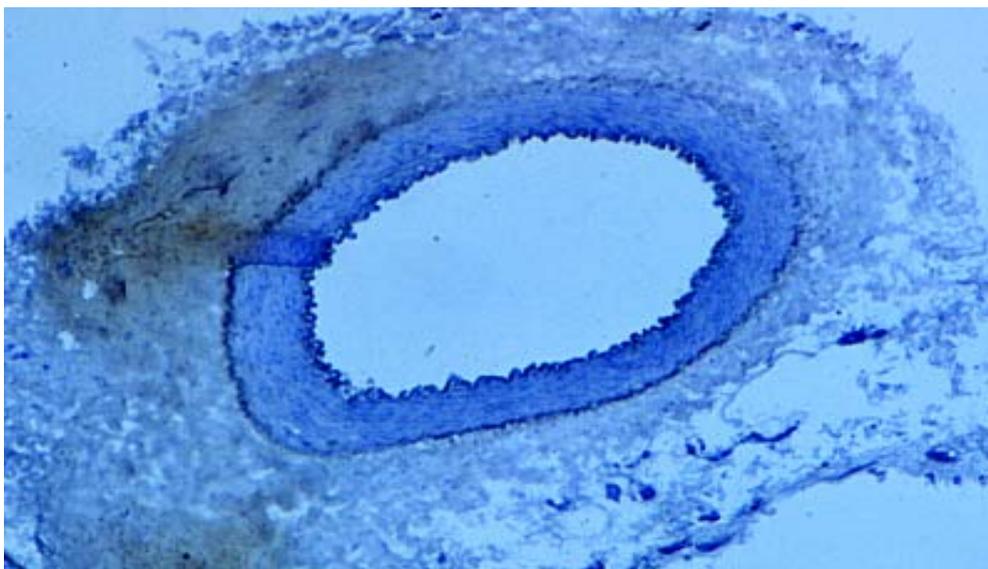


Abbildung 14 Stimulation mit 10U/l XO (40x)

Die stimulierten Gefäße zeigen bei dieser Einfrieremethode eine intakte Schichtung der Wand.

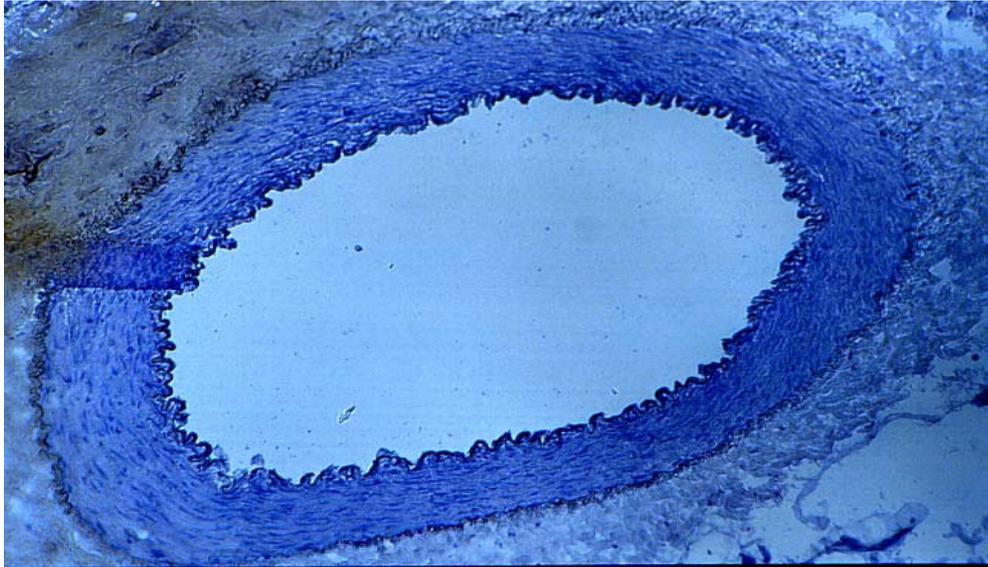


Abbildung 15 Stimulation mit 10U/l XO (100x)

Bei dieser Vergrößerung gelingt die Darstellung der Wandschichten. Das Gewebe ist intakt.

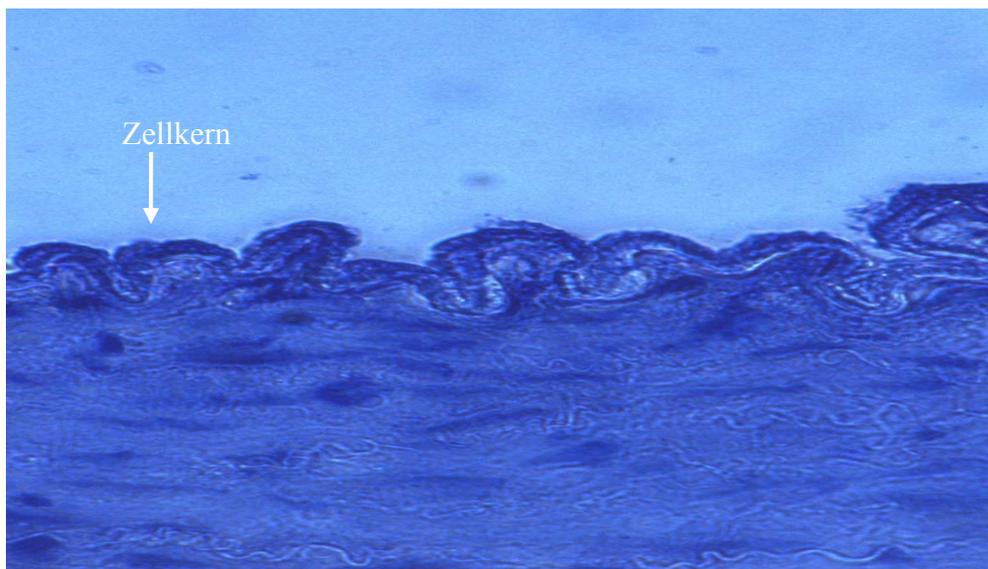


Abbildung 16 Stimulation mit 10U/l XO (600x)

In dieser Darstellung lassen sich die Zellkerne der Endothelzellen gut darstellen (Pfeil).

4.2.2. Peroxidase-Färbung

Die Peroxidase-Färbung nutzt die Möglichkeit, immunhistochemisch die Verteilung des Endothelins bei stimulierten Gefäßen und Kontrollen zu vergleichen. Durch den Sekundär-Antikörper und die Peroxidase-Reaktion wurde das Big-Endothelin dargestellt. In den Schnitten kann man sehr gut die Verteilung des Proteins hauptsächlich endothelial, aber auch im Bereich der Media erkennen. In der Adventitia sind ebenfalls vereinzelt reaktive Zellen zu sehen (s. Abbildungen 17 bis 19).

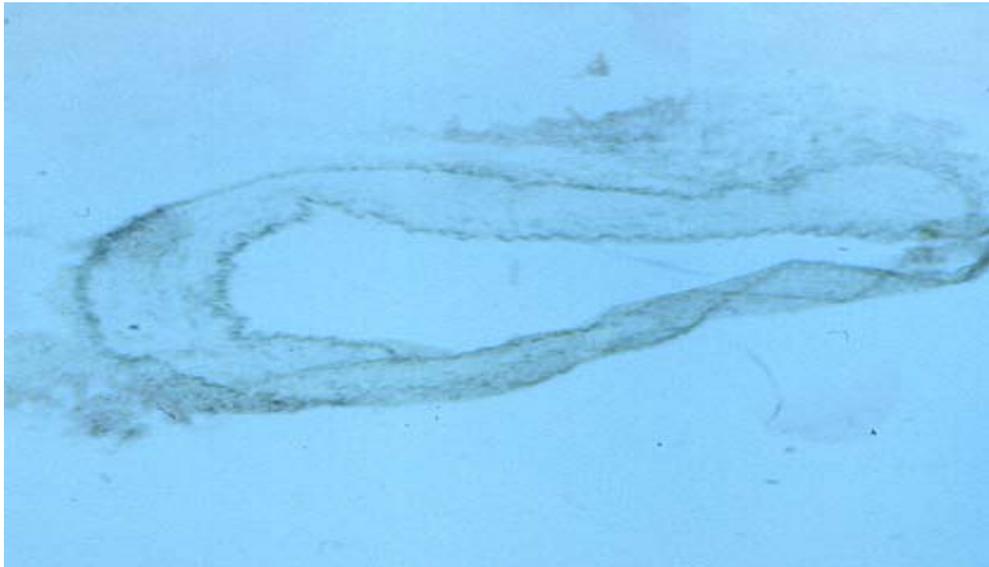


Abbildung 17 Kontrollgefäß (40x)

Das Kontrollgefäß zeigt eine geringe Menge an Big-Endothelin. Alle Schichten der Arterie sind positiv gefärbt.

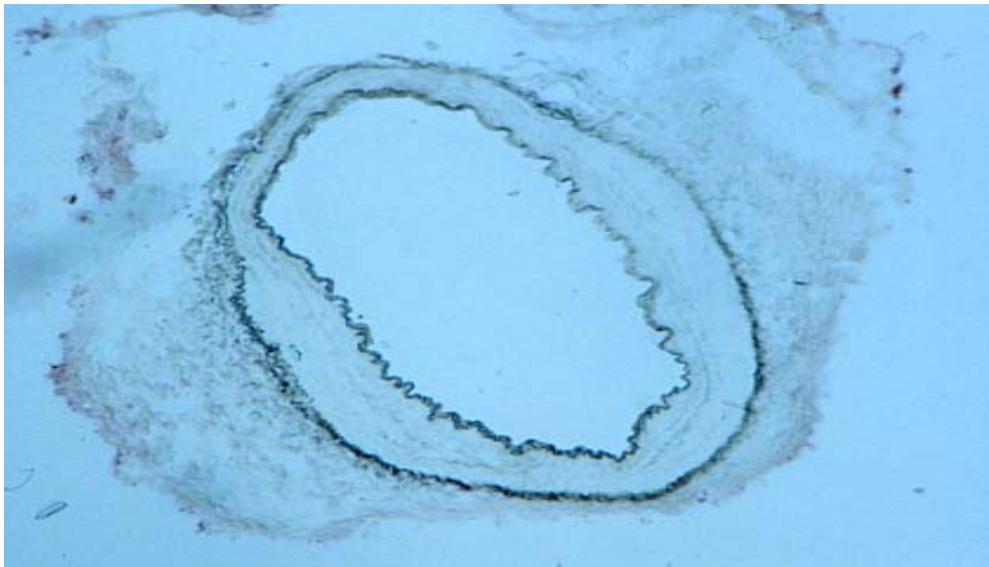


Abbildung 18 Stimulation mit 10U/l (40x)

Das Bild zeigt das gleiche Gefäß, nur diesmal unter Stimulation mit 10U/l XO. Im Vergleich zur Kontrolle sind die Endothelzellen und die Zellen der Media deutlich stärker angefärbt.

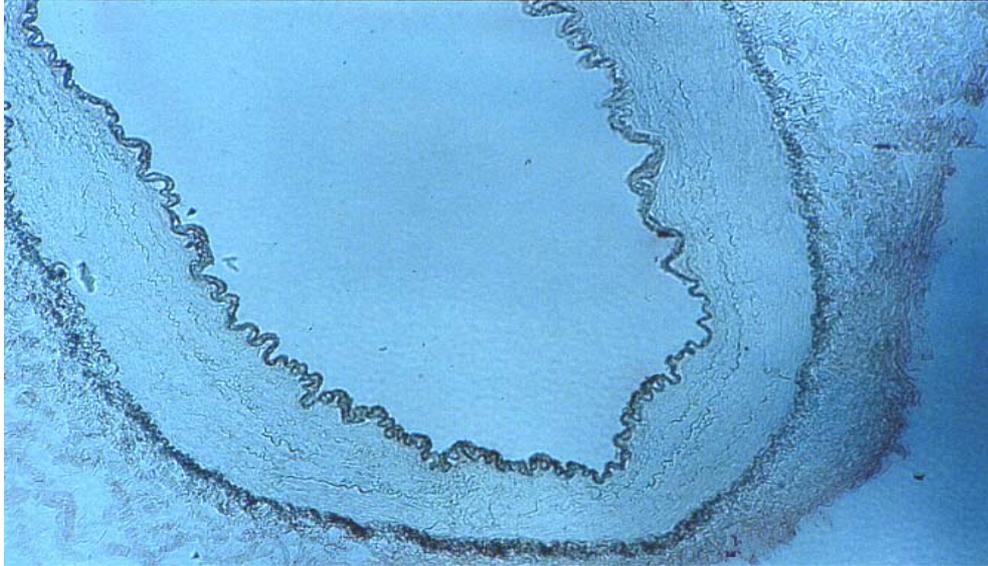


Abbildung 19 Stimulation mit 10U/l XO (100x)

In der stärkeren Vergrößerung ist der Unterschied zwischen Intima und Media gut erkennbar.

4.2.3. ABC-AP-Färbung

Die ABC-AP-Färbung wurde im Kapitel 3.5.3. beschrieben. Die Vector[®] Red Reaktion bewirkt eine Rotfärbung. Diese Färbung kann man bereits unter dem Lichtmikroskop beobachten. Zusätzlich ist die Darstellung des fluoreszierenden Farbstoffs unter einem Rotfilter möglich. Neben der Autofluoreszenz der elastischen Strukturen ist die Identifizierung des Antikörpers und der Wandstrukturen sehr gut möglich. Um eine Aussage über die gebildete Endothelinmenge machen zu können, wurden die Schnitte wie im „Material und Methoden“-Teil beschrieben angefertigt und mit Big-Endothelin-Antikörper inkubiert. In den Abbildungen 20 bis 23 ist zweifelsfrei das gefärbte Big-Endothelin dargestellt. Beim Vergleich der Kontrollen und der stimulierten Gefäße beider Proben ist deutlich der Unterschied durch eine Mehranreicherung erkennbar. Dabei fällt auf, dass das Endothel sich am stärksten darstellt. Sowohl die Media als auch Teile der Adventitia sind mit angefärbt.

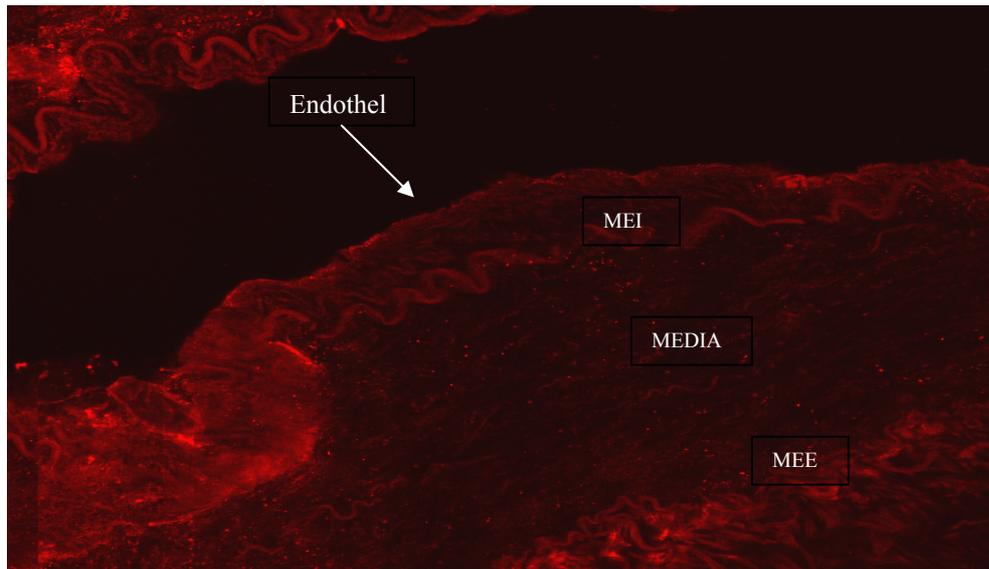


Abbildung 20 Kontrollgefäß (200x)

Die Abbildung zeigt die Gefäßwand einer Arteria mammaria interna ohne Stimulation mit XO. Durch die Färbung des Endothelins kann schon in der Kontrolle bereits höhere Konzentrationen im Endothel ausgemacht werden (Pfeil). MEI: Membrana Elastica Interna, MEE: Membrana Elastica Externa.

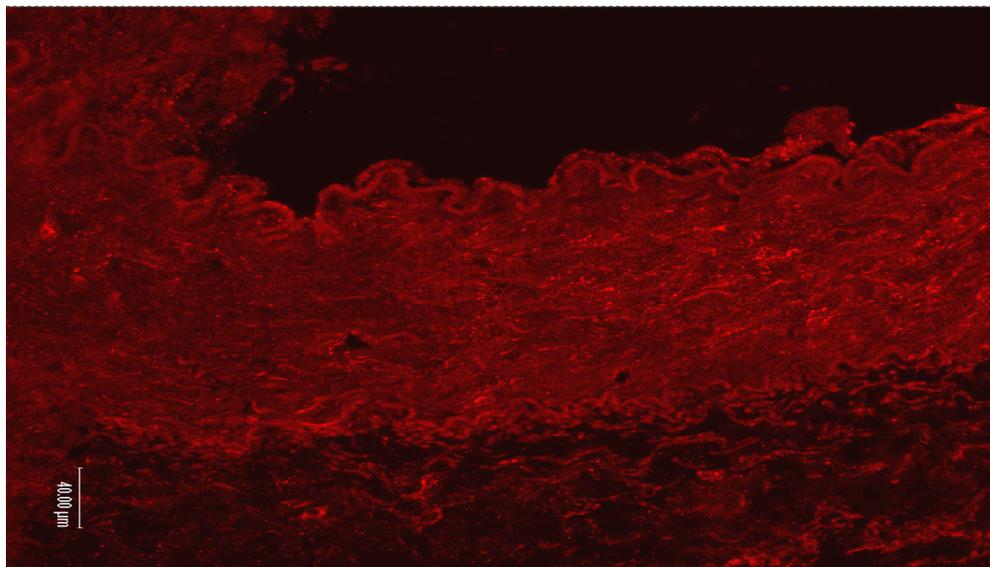


Abbildung 21 Stimulation mit 10U/l XO (200x)

Das Bild zeigt die Gefäßwand einer Arterie, die mit 10U/l XO stimuliert wurde.

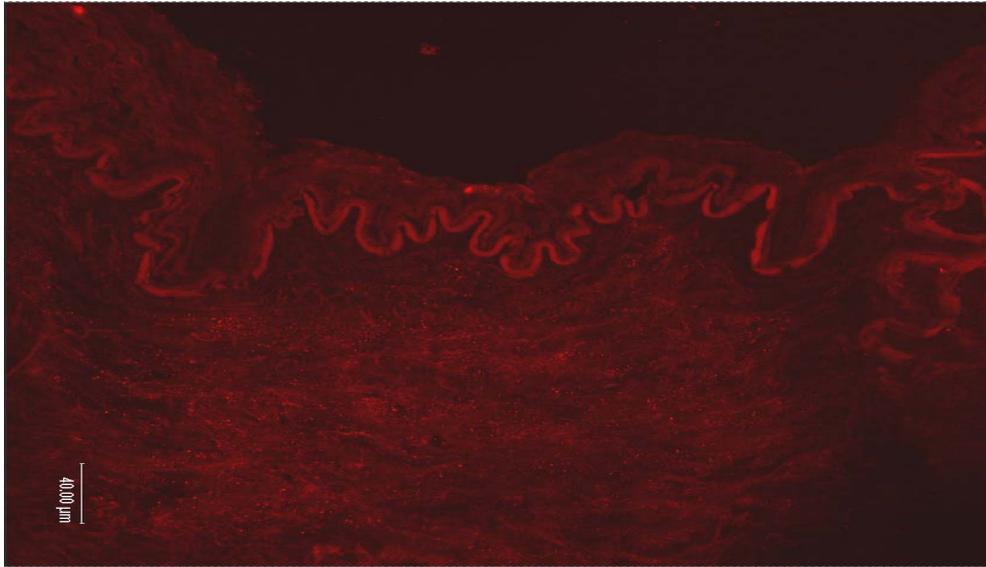


Abbildung 22 Kontrollgefäß (200x)

In den Kontrollen überwiegt die Darstellung der autofluoreszierenden Elemente der Arterien.

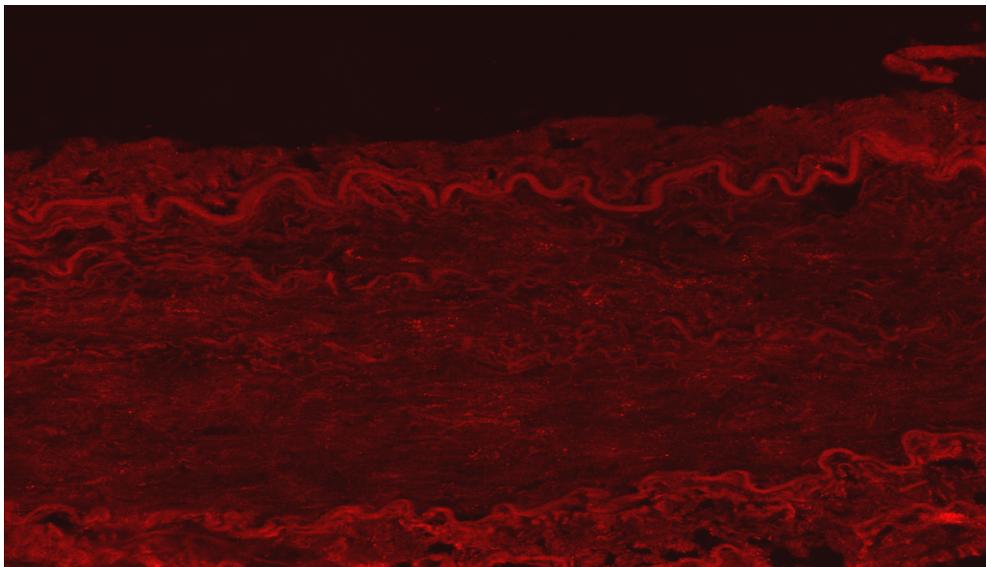


Abbildung 23 Stimulation mit 10U/l XO (200x)

Die stimulierten Gefäße zeigen deutlich die Mehranreicherung des Antikörpers, aufgrund der höheren Big-Endothelin-Konzentration.

4.2.4. CyTM-Färbung

Diese Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht die Verteilung des Big-Endothelins besser darzustellen. Die Schnitte wurden unter einem Leica Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung durch einen Grünfilter betrachtet. Der Sekundär-Antikörper leuchtete dabei deutlich grün.

In den Abbildungen 24 bis 26 sind unterschiedliche Färbeintensitäten im Vergleich zwischen Kontrollen und Stimulationen erkennbar. Diese Eigenschaft konnte für die Auswertung (s. Kapitel 4.5.) genutzt werden. Die Abbildungen 27 & 28 zeigen das markierte Big-Endothelin in starker Vergrößerung.

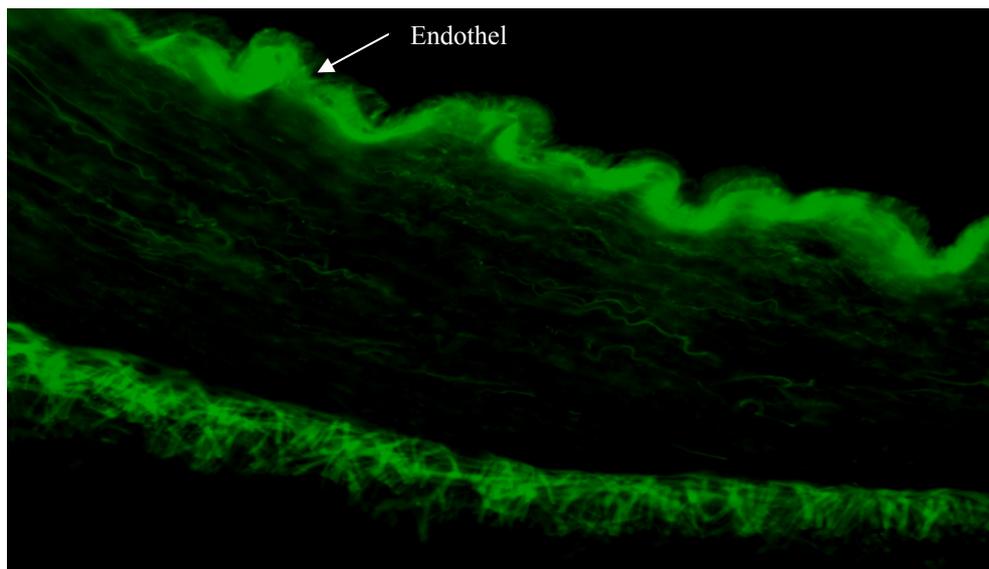


Abbildung 24 Kontrollgefäß (200x)

In dieser Aufnahme ist neben den elastischen Fasern auch gut das Endothel dargestellt (Pfeil). Es färbt sich leicht an.

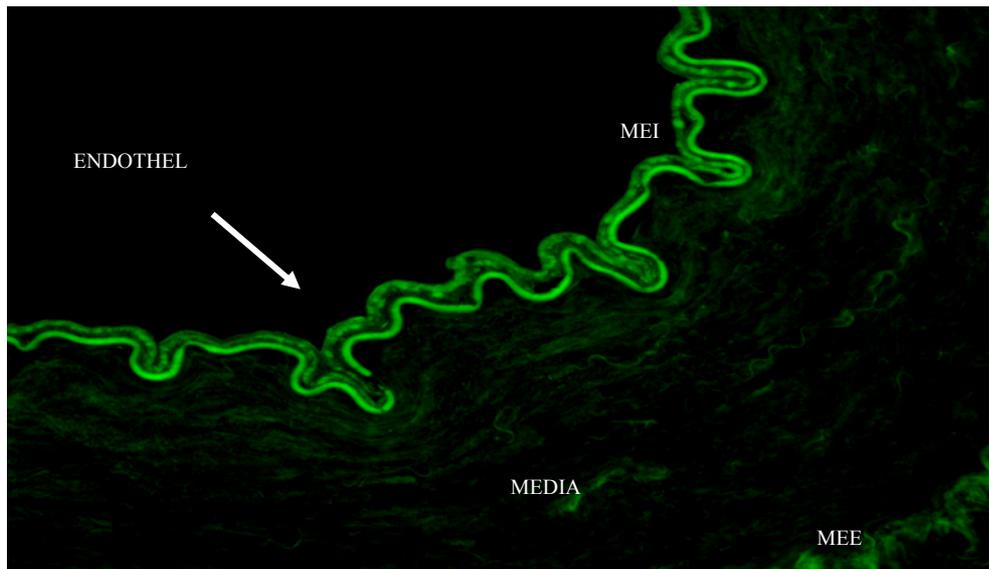


Abbildung 25 Stimulation mit 5U/l XO (200x)

Das Bild zeigt eine Wand einer Arterie, die zuvor mit 5U/l XO stimuliert wurde. Erkennbar ist, dass das Endothel (Pfeil) eine höhere Konzentration an Big-ET-1 aufweist. MEI: Membrana Elastica Interna, MEE: Membrana Elastica Externa.

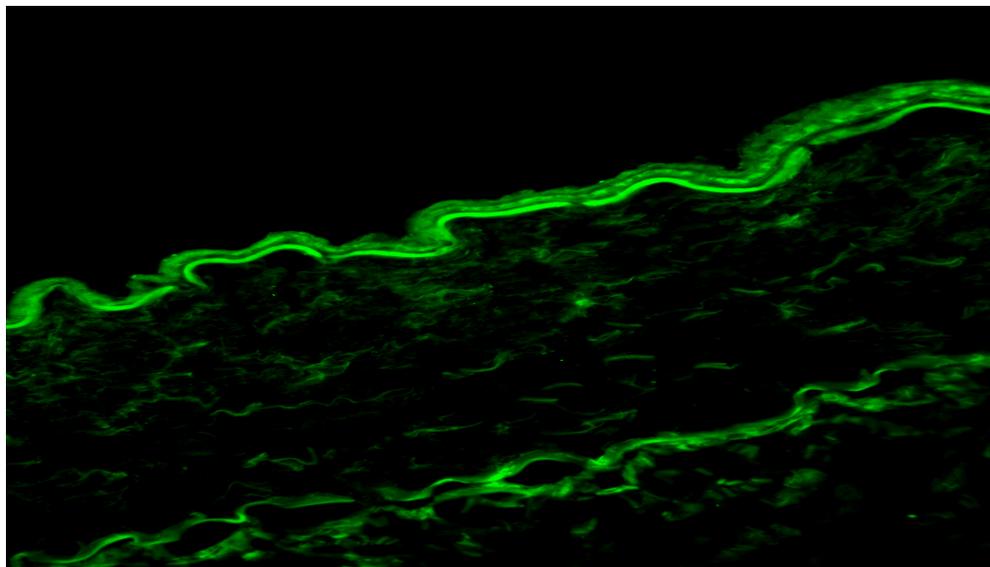


Abbildung 26 Stimulation mit 10U/l XO (200x)

Bei der Stimulation mit 10U/l XO ist die Big-ET-1 Konzentration im Bereich des Endothels noch höher.

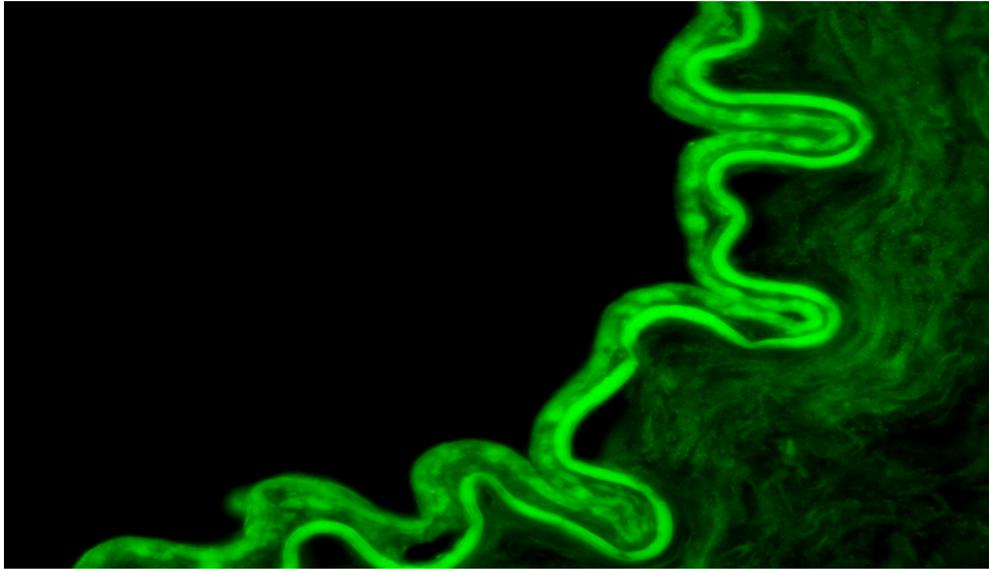


Abbildung 27 Stimulation mit 5U/l XO (400x)

Die stärkere Vergrößerung zeigt, wie sich der Endothelinantikörper hauptsächlich im Bereich des Endothels nachweisen lässt.

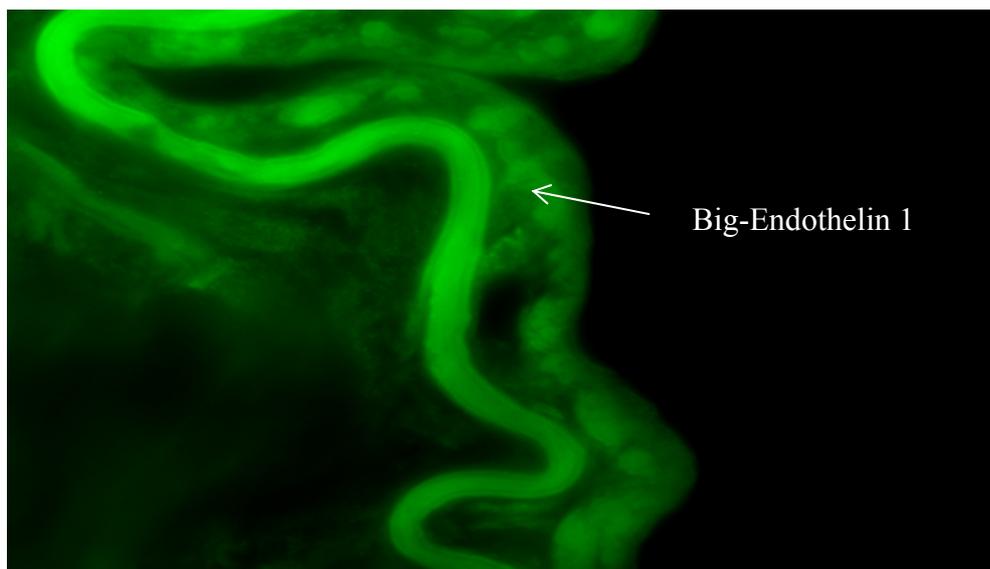


Abbildung 28 Stimulation mit 5U/l XO (1000x)

Das Big-Endothelin-1 lässt sich in Haufen intra- und extrazellulär nachweisen.

4.2.5. α -Smooth Muscle Actin-Färbung

Die α -Smooth Muscle Actin-Färbung färbt speziell die glatten Muskelzellen der Gefäßwände an. Damit ist die Identifizierung der Schichten der Arterienwand möglich. In den Abbildungen 29 und 30 ist vor allem die Media, die Schicht mit dem größten Anteil an VSMC, dargestellt. Die Endothelzellen sind in dieser Färbung nicht dargestellt. Das schwache Signal des Endothels wird durch Eigenfluoreszenz verursacht.

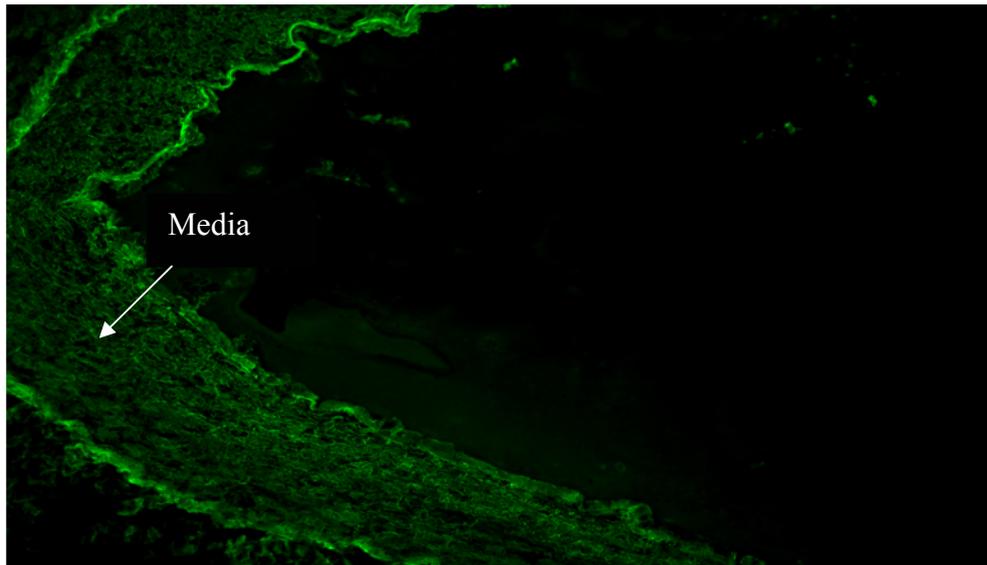


Abbildung 29 α -Smooth Muscle Actin (100x)

Die Abbildung zeigt die Darstellung der VSMC mit Hilfe der α -Smooth Muscle Actin-Färbung. Das Endothel färbt sich dabei nicht.

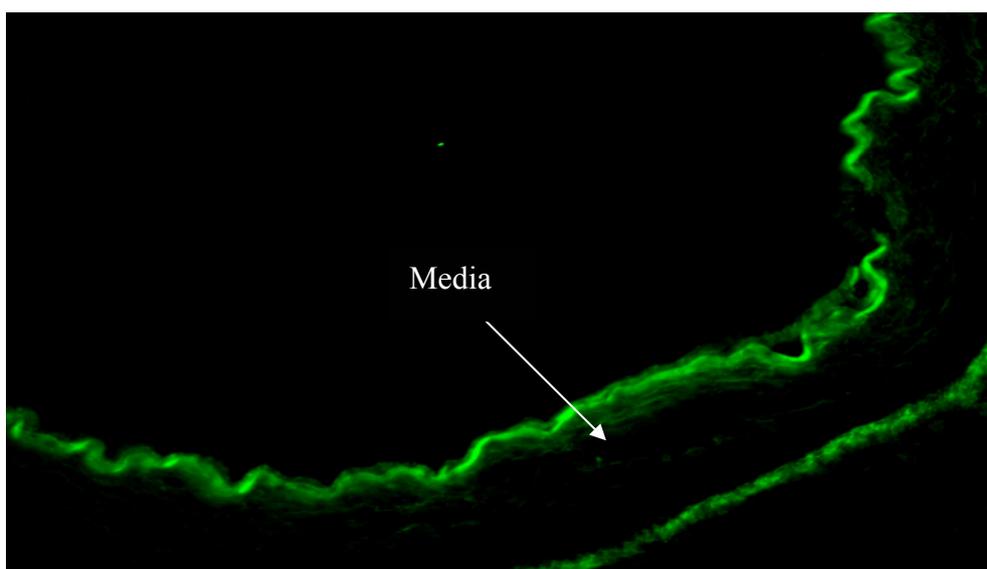


Abbildung 30 Big-Endothelin-1 (100x)

In diesem Bild ist selektiv das Big-Endothelin-1 dargestellt. Zu erkennen ist die Anreicherung im Bereich des Endothels. Die Media zeigt lediglich Eigenfluoreszenz.

4.5. Auswertung der semiquantitativen Bestimmung des Big-Endothelins

Die Fluoreszenzintensität wurden wie in Kapitel 3.6. beschrieben ermittelt. Von den 6 gemessenen Werten wurde dann der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Der Unterschied zwischen Kontrolle und 5 U/l war 20%, zwischen 5 U/l und 10 U/l 65% und zwischen 10 U/l und 10 U/l + SOD + Cat 52%. Dabei konnte statistisch eine deutliche Signifikanz zwischen den Kontrollen vs. 10 U/l ($p < 0,01$) und 10 U/l vs. 10 U/l + SOD + Catalase ($p < 0,01$) ermittelt werden. Der Unterschied zwischen den Kontrollen vs. 5 U/l ($p = 0,1066$), sowie den Kontrollen vs. 10 U/l + SOD + Catalase ($p = 0,3931$) war nicht signifikant. Zur Berechnung der Signifikanzen wurde der Students-T-Test verwendet. Dabei wurden zwei Stichproben gleicher Varianz und ein zweiseitiger Test benutzt.

Tabelle 3 Fluoreszenzintensitäten für Probe A 1

Probennummer	Kontrolle	5 U/l	10 U/l	10 U/l + SOD + Cat
A 1		51,78	100,79	67,6
		37,22	124,2	76,78
		50,99	90,21	80,69
		56,99	108,07	67,18
		57,25	101,58	65,76
		54,48	102,36	81,46
Mittelwert		51,45	104,54	73,25
Standardabweichung		7,43	11,24	7,21
SEM		3,03	4,59	2,94
p (5U/l – 10U/l)	< 0,01			
p (10 U/l – 10U/l + SOD + Cat)	< 0,01			
p (5U/l – 10U/l + SOD + Cat)	< 0,01			

Tabelle 4 Fluoreszenzintensitäten für Probe A 2

Probennummer	Kontrolle	5 U/l	10 U/l	10 U/l + SOD + Cat
A 2	136,46	101,36	141,51	
	106,57	102,21	120,16	
	143,74	99,97	133,69	
	99,78	91,02	142,49	
	112,2	91,69	110,46	
	87,03	96,04	112,51	
Mittelwert	114,30	97,05	126,80	
Standardabweichung	21,80	4,90	14,32	
SEM	8,90	2,00	5,85	
p (Kontrolle – 5U/l)	< 0,01			
p (Kontrolle – 10U/l)	< 0,01			
p (5U/l – 10U/l)	< 0,01			

Tabelle 5 Fluoreszenzintensitäten für Probe A 3

Probennummer	Kontrolle	5 U/l	10 U/l	10 U/l + SOD + Cat
A 3	27,46		133,01	66,68
	42,35		136,41	48,2
	16,82		114,93	46,42
	34,71		99,04	51,04
	48		133,11	41,95
	33,35		118,05	22,46
Mittelwert	33,78		122,43	46,13
Standardabweichung.	10,99		14,45	14,34
SEM	4,49		5,90	5,86
p (Kontrolle – 10U/l)	< 0,01			
p (Kontrolle – 10U/l + SOD + Cat)	0,0935			
p (10 U/l – 10U/l + SOD + Cat)	< 0,01			

Tabelle 6 Fluoreszenzintensitäten für Probe A 4

Probennummer	Kontrolle	5 U/I	10 U/I	10 U/I + SOD + Cat
A 4	58,68	57,76		
	54	67,01		
	41,37	52,78		
	38,18	75,15		
	51,06	68,55		
	22,51	67,28		
Mittelwert	44,3	64,76		
Standardabweichung	13,17	8,08		
SEM	5,38	3,30		
p (Kontrolle – 5U/I)	< 0,01			

Tabelle 7 Fluoreszenzintensitäten für Probe A 5

Probennummer	Kontrolle	5 U/l	10 U/l	10 U/l + SOD + Cat
A 5	26,91		89,87	34,68
	51,46		100,32	30,88
	52		114,01	62,47
	42,02		119,1	68,03
	49,31		133,4	64,23
	41,04		141,07	41,34
	Mittelwert	43,79		116,30
Standardabweichung	9,51		19,35	16,48
SEM	3,88		7,90	6,73
p (Kontrolle – 10U/l)	< 0,01			
p (Kontrolle – 10U/l + SOD + Cat)	0,1799			
p (10U/l – 10U/l + SOD + Cat)	< 0,01			

Tabelle 8 Zusammenfassung der Fluoreszenzintensitäten der Pr.A 1-5

Probennummer	Kontrolle	5 U/l	10 U/l	10 U/l + SOD + Cat
A 1		51,78	100,79	67,6
		37,22	124,2	76,78
		50,99	90,21	80,69
		56,99	108,07	67,18
		57,25	101,58	65,76
		54,48	102,36	81,46
A 2	136,46	101,36	141,51	
	106,57	102,21	120,16	
	143,74	99,97	133,69	
	99,78	91,02	142,49	
	112,2	91,69	110,46	
	87,03	96,04	112,51	
A 3	27,46		133,01	66,68
	42,35		136,41	48,2
	16,82		114,93	46,42
	34,71		99,04	51,04
	48		133,11	41,95
	33,35		118,05	22,46
A 4	58,68	57,76		
	54	67,01		
	41,37	52,78		
	38,18	75,15		
	51,06	68,55		
	22,51	67,28		
A 5	26,91		89,87	34,68
	51,46		100,32	30,88
	52		114,01	62,47
	42,02		119,1	68,03
	49,31		133,4	64,23
	41,04		141,07	41,34
Mittelwert	59,04	71,09	117,51	56,55
Standardabweichung	35,60	20,75	16,49	17,50
SEM	14,53	8,47	6,73	7,15
p (Kontrolle – 5 U/l)	0,1066			
p (10 U/l – 10 U/l + SOD + Cat)	< 0,01			
p (Kontrolle – 10 U/l)	< 0,01			
p (Kontrolle – 10 U/l + SOD + Cat)	0,3931			

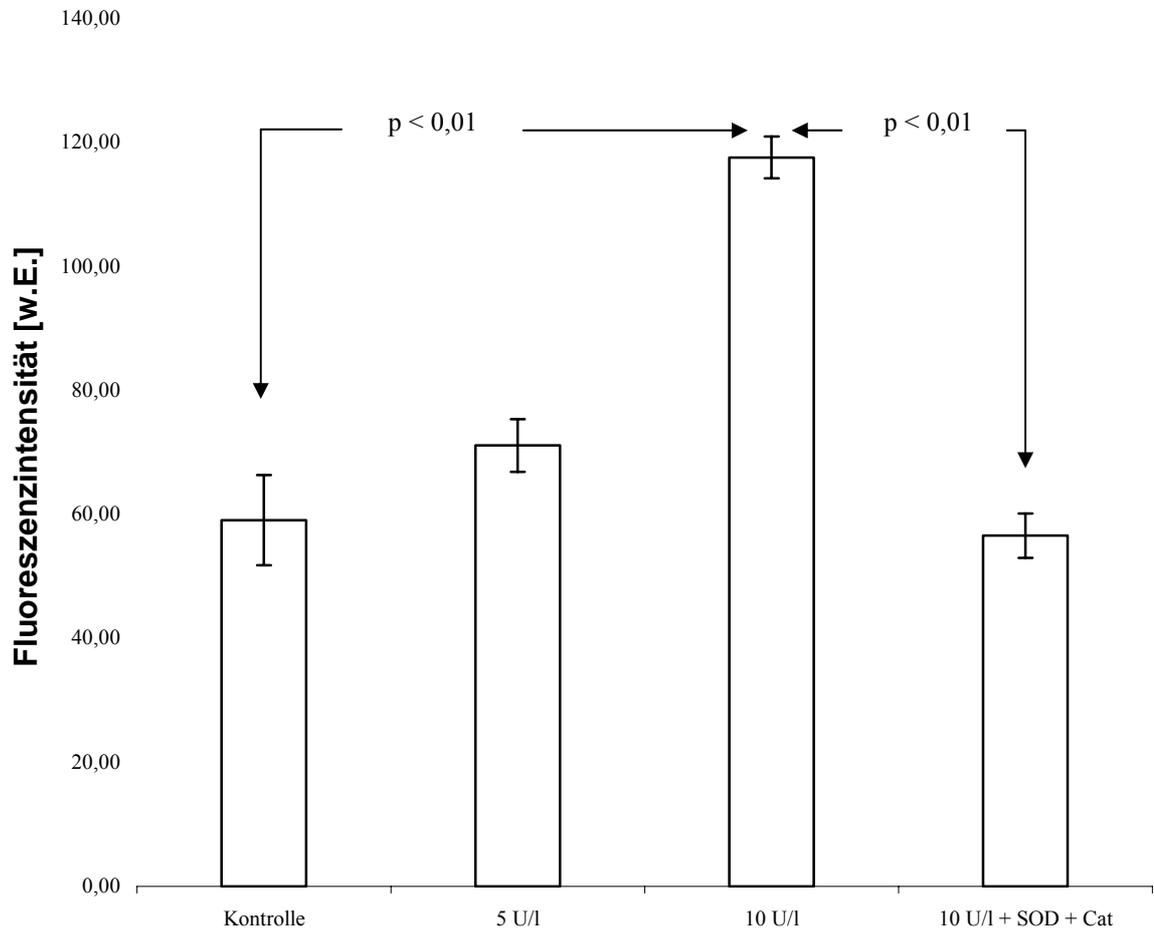


Abbildung 31 Fluoreszenzintensitäten der Proben A1-5

Das Diagramm zeigt die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlichen Konzentrationen von XO während der 4-stündigen Stimulation. Zum Vergleich ist links die Kontrollgruppe aufgetragen. Die eingezeichneten Werte für „p“ entsprechen der statistischen Signifikanz.

4.6. ELISA

Die Messung der Proben erfolge wie in Kapitel 3.7.5. beschrieben. Von den Messwerten wurden dann Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet.

Der Unterschied zwischen der Kontrolle und der 4h-Inkubation mit 10^{-5} mol/ l Angiotensin II betrug 23% (statistisch nicht signifikant $p= 0,3751$).

Es gab keine Änderung beim Vergleich 4h-Inkubation mit der 4h+8h in PBS-Inkubation. Der Unterschied zwischen 8h und 12h in PBS betrug 27%, war statistisch ($p=0,3157$) nicht signifikant. Zur Berechnung wurde der Student-T-Test verwand. Es wurden zwei gepaarte Stichproben und ein einseitiger Test benutzt.

4.6.1. Ergebnisse des Big-Endothelin-ELISA

Tabelle 9 Big-Endothelinkonz. in fmol/mg der Kontrollen (B 1-3) /1

Proben B	Kontrollgruppe 4h	Kontrollgruppe 4h+8h	Kontrollgruppe 4h+20h	Mittelwert der Kontrollen
B 1	0,69	0,61	0,36	0,55
B 2	0,07	-0,01	0,04	0,03
B 3	0,08	0,03	0,03	0,05
Mittelwert	0,28	0,21	0,14	0,21
Standardabweichung	0,36	0,35	0,19	0,29
SEM	0,21	0,20	0,11	0,17

Tabelle 10 Big-Endothelinkonz. in fmol/mg der Proben (B 1-3) /2

Proben B	4h Stimulation	Stimulation 4h + 8h PBS	Stimulation 4h + 12h PBS
B 1	0,37	0,70	0,54
B 2	0,07	-0,03	0,08
B 3	0,34	0,11	0,38
Mittelwert	0,26	0,26	0,33
Standardabweichung	0,17	0,39	0,23
SEM	0,10	0,22	0,13
SEM/ 2	0,05	0,11	0,07
p (Kontrolle/ 4h Inkubation)	0,3751		
p (Kontrolle/ 4h + 8 h PBS)	0,2371		
p (Kontrolle/ 4h + 12h PBS)	0,1794		
p (4h + 8h/ 4h + 12h PBS)	0,3157		

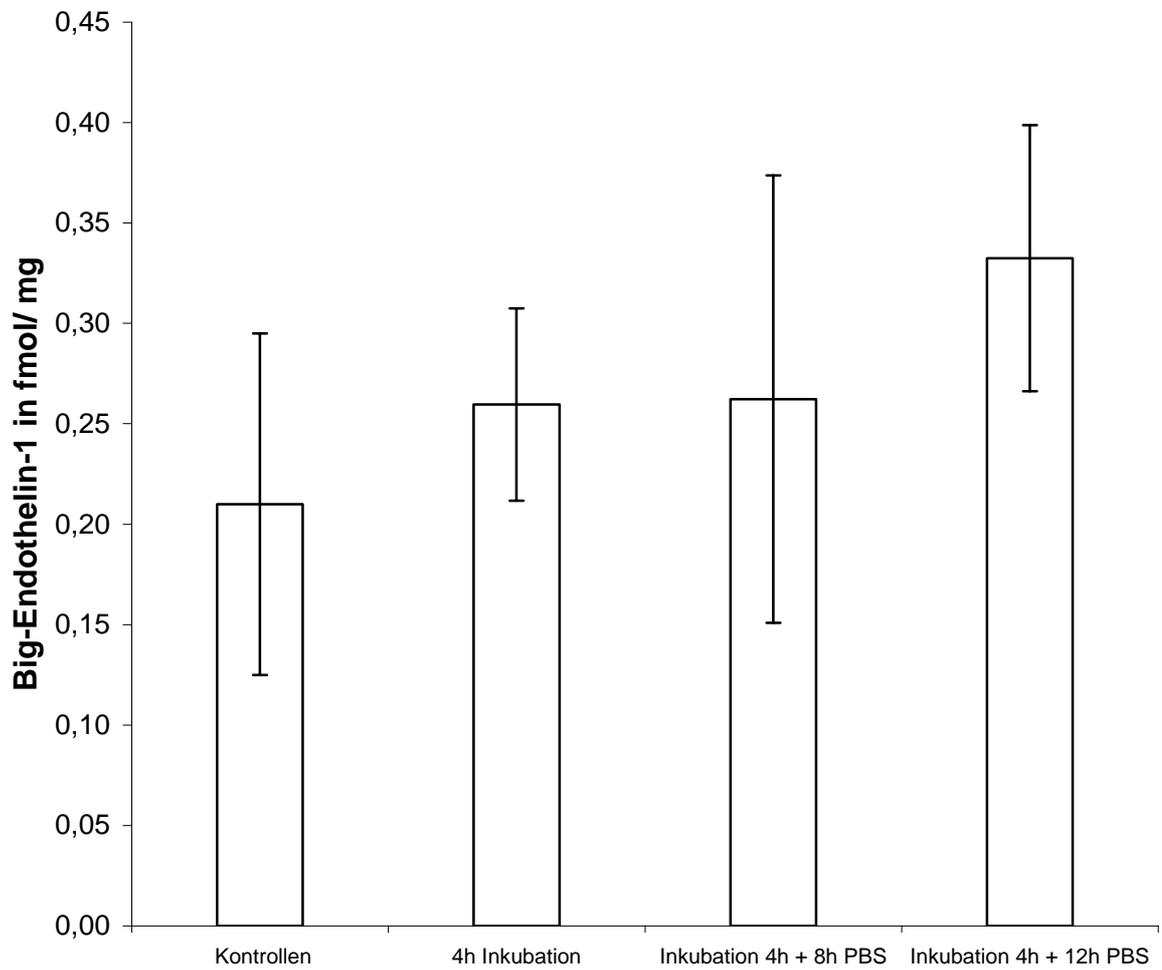


Abbildung 32 Stimulation mit Angiotensin II Probe B1-3

Das Diagramm zeigt die durchschnittlichen Big-Endothelin-1 Konzentrationen unter 4-stündiger Stimulation mit 10^{-5} mol/l Angiotensin II. Nach 4h Inkubation steigt die Konzentration über 20h ohne Stimulation durch Angiotensin II.

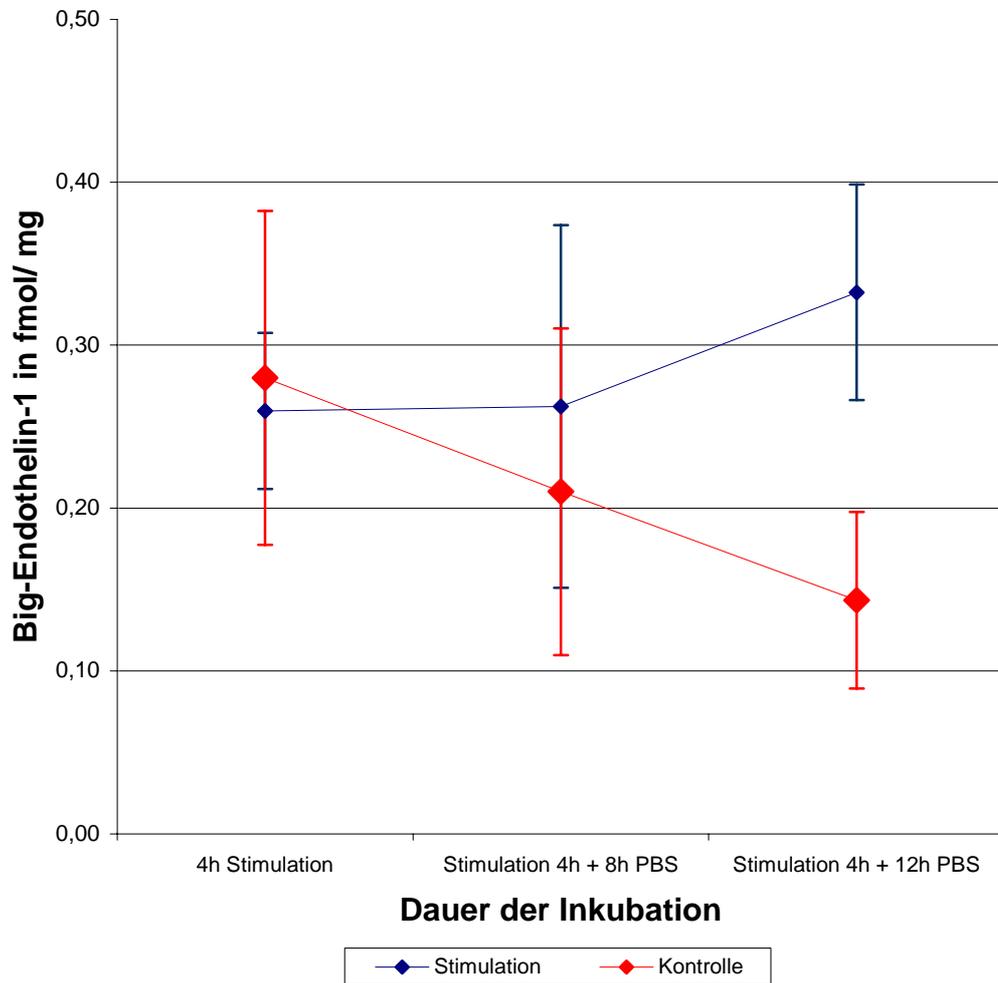


Abbildung 33 Zeitlicher Verlauf der Stimulation mit Angiotensin II

Das Diagramm zeigt den zeitlichen Verlauf des Big-Endothelin-1-Konzentrationsanstieges. Im Vergleich zur Kontrolle steigt die Konzentration auch ohne Vorhandensein von Angiotensin II weiter.

5. Diskussion

Erkrankungen des vaskulären Systems zählen zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus, werden für die Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen verantwortlich gemacht und gemeinsam mit Adipositas unter dem Begriff „Metabolisches Syndrom“ zusammen gefasst. Diese Veränderungen sind häufig die Ursache für hypertensive und ischämische Herzerkrankungen, Nierenerkrankungen, ischämische Insulte und periphere arterielle Verschlusskrankheiten. Da diese Erkrankungen nicht nur durch Diagnostik, sondern auch bei der Behandlung einen erheblichen volkswirtschaftlichen Anteil ausmachen, ist die Klärung der Ursachen von besonderem Interesse. Die Erkenntnisse über die molekularbiologischen Veränderungen können dann in der Behandlung, sowie in der Prävention von großem Nutzen sein.

Bei der Entwicklung der Arteriosklerose und deren Folgeerkrankungen für das kardiovaskuläre System ist das Endothel von besonderem Interesse. Die Intaktheit dieser Schicht ist für die Prävention pathologischer Veränderungen notwendig und kann durch lokale Prozesse und oxidativen Stress alteriert werden.

Diese Funktionsbeeinträchtigung wird unter dem Begriff endotheliale Dysfunktion zusammengefasst. Dieser Zustand ist der Vorläufer der Arteriosklerose und geht mit biochemischen und strukturellen Veränderungen der Arterienwand einher. Erhöhte Endothelin-1-Spiegel in Gefäßwandmuskelzellen führen zu einer verstärkten Stimulation von Zellproliferation und Hypertrophie, wie sie in hypertensiven und hypercholesterinämischen Vaskulopathien beobachtet werden können (Touyz and Schiffrin 2003). Vor allem oxidativer Stress scheint eine Hauptrolle in der Regulation des lokalen Endothelins zu haben. Die Überproduktion und fehlende Neutralisation von freien Radikalen führt beispielsweise zur Oxidierung von LDL-Partikeln und verminderte NO-Aktivität und ist die allgemein akzeptierte Ursache für die endotheliale Dysfunktion (Maxwell 2000; Jarasuniene and Simaitis 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass radikale Sauerstoffspezies eine Erhöhung der endogenen Endothelin-1-Synthese in Arteria mammaria interna-

Segmenten *ex vivo* bewirken. Dieser Effekt konnte durch Einsatz von Radikalscavengern reduziert werden. Reaktive Sauerstoffspezies verursachen endotheliale und vasomotorische Dysfunktionen unter atherogenen Bedingungen (Barton 2000; Kähler, Ewert et al. 2001).

Desweiteren wurde der zeitabhängige Verlauf der Endothelin-1-Konzentration nach Stimulation mit Angiotensin II wiederum in humanen Arteria mammaria interna gezeigt.

In früheren Experimenten konnte die Kontraktionseigenschaft von Sauerstoffradikalen bereits belegt werden (Katusic and Vanhoutte 1989; Katusic, Schugel et al. 1993). Ist die Kontraktion allein durch die Anwesenheit von Radikalen begründet, oder ist die gesteigerte Endothelin-Synthese Ursache für dieses Phänomen? Diese Frage konnte bis jetzt nicht geklärt werden.

In mehreren Untersuchungen wurde bereits festgestellt, dass sowohl VSMC als auch VEC unter oxidativem Stress vermehrt Endothelin bilden (Hassan, Kashimura et al. 1997; Kähler, Ewert et al. 2001; Kähler, Sill et al. 2002; Masatsugu, Itoh et al. 2003). Durch die Unterbindung der Arteria gastrica sinistra bei Ratten konnten Hassan et al. (1997) einen signifikanten Endothelin-1 Anstieg messen und zusätzlich einen erheblichen Mukosachaden beobachten. Dieser Effekt konnte auch noch 30 min nach Reperfusion gemessen werden. Durch den Einsatz des Endothelin-Rezeptor-Antagonisten Bosentan und den Radikalscavengern SOD, Catalase und Deferoxamin wurde der Schleimhautschaden vermindert.

Da Endothelin-1 als starker Vasokonstriktor bekannt ist, wird eine Modulation der Hormonsynthese durch reaktive Sauerstoffspezies angenommen, die die Effekte zumindest partiell erklären können.

5.1. Die Wirkung von Sauerstoffradikalen auf die Endothelin-1-Protein-Konzentration

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass unter dem Einfluss von Sauerstoffradikalen, erzeugt durch Inkubation von Arteria mammaria interna-Segmenten mit dem Sauerstoffradikal generierenden System X/XO, die Endothelin-Konzentration in humanen Arteria mammaria interna ansteigt.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig ist. So wurde ermittelt, dass bei der Inkubation mit 5U/l XO die mittlere Endothelin-1-Konzentration auf 120% des Kontrollwertes gestiegen ist. Unter 10U/l XO stieg die Konzentration um das Doppelte des Ausgangswertes an. Zusätzlich wurde durch Koinkubation mit Superoxiddismutase und Catalase demonstriert, dass die Wirkung des radikalgenerierenden Systems X/XO spezifisch auf die Anwesenheit von Superoxidanionen und Hydroxylanionen zurückzuführen ist. Dabei wurde die unter 10U/l beobachtete Erhöhung vollständig aufgehoben. Diese Effekte wurden semiquantitativ mit Hilfe der Fluoreszenzintensität ermittelt. Die quantitative Bestimmung des Big-Endothelin-1 mittels ELISA steht noch aus und ist Gegenstand weiterer Arbeiten zu diesem Thema.

In In-Vitro-Experimenten konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits festgestellt werden, dass in kultivierten VSMC und VEC unter oxidativem Stress die Endothelin-1-Spiegel ansteigen (Kähler, Mendel et al. 2000; Kähler, Ewert et al. 2001; Kähler, Sill et al. 2002). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Zunahme der Endothelin-Konzentration auf die spezifische Wirkung radikaler Sauerstoffspezies zurückzuführen ist.

Gegenteilige Beobachtungen wurden allerdings von Love et al. (1995) beobachtet. Oxidativer Stress führte zur Abnahme von Endothelin-1-Spiegeln in pulmonalen Gefäßendothelzellen (Love and Keenan 1998). Dies widerspricht der Annahme, dass Endothelin-1 für die Vasokonstriktion hauptsächlich verantwortlich ist. Allerdings verwendete die Arbeitsgruppe Xanthinoxidasekonzentrationen von 20U/l. Sauerstoffradikale haben aber zytotoxische und denaturierende Eigenschaften, die eine Verminderung der Konzentration des messbaren Endothelin-1 bewirken können. So ist lediglich die extrazelluläre, nicht aber die zytoplasmatische Endothelin-1-Konzentration, diesem Effekt unterlegen. Zytotoxische Effekte scheinen jedoch in dieser Studie nicht im relevanten Umfang vorgelegen zu haben, obwohl hohe

Konzentrationen an Sauerstoffradikalen verwandt wurden. So wurde weder lichtmikroskopisch noch durch selektive Darstellung des α -Smooth Muscle Actin Hinweise für zytotoxische Effekte gefunden.

5.2. Wirkung von Angiotensin II auf die Endothelin-1-Protein-Konzentration

Die Endothelin-1-Synthese wird durch zahlreiche vasoaktive Substanzen, wie z.B. Angiotensin II stimuliert (Imai, Hirata et al. 1992; Ferri, Desideri et al. 1999). So wurde in dieser Arbeit die Abhängigkeit der Endothelin-1-Konzentration von der Inkubation mit Angiotensin II demonstriert. Nach 4h Stunden stieg die mittlere Endothelin-1-Konzentration auf 123% des Kontrollwertes.

Im weiteren Verlauf wurde gezeigt, dass die Synthese des ET-1 auch ohne weitere Inkubation mit Angiotensin II stimuliert bleibt. So wurde keine Änderung der Konzentration nach 8h, aber nach weiteren 20h beobachtet. Hierbei erhöhte sich der Wert auf 157% der Kontrolle. Die Änderungen waren statistisch nicht signifikant.

Die Bedeutung des Angiotensin II und die dosisabhängige Stimulation der ET-1-Synthese wurde bereits von Imai et al. (1992) und durch Ferri et al. (1999) gezeigt (Imai, Hirata et al. 1992; Ferri, Desideri et al. 1999).

Diese Ergebnisse lassen zwei Interpretationen zu. Zum einen ist anzunehmen, dass die stimulierte Proteinbiosynthese nach 4h Inkubation auch ohne weitere Stimulation fortläuft. Im Gegensatz dazu ist ebenso möglich, dass die alleinige Inkubation in PBS und O₂-Insufflation eine Situation mit oxidativen Stress schafft, die über die Stimulation mit Angiotensin II hinaus einen additiven Effekt auf die Synthese hat. Diese Variante ist unwahrscheinlich, da in den Experimenten die Kontrollen über denselben Zeitraum einen Abfall der ET-1-Konzentration verzeichnen. So wurde in der Arbeitsgruppe Chua et al. (1993) bei der Inkubation kultivierten Rattenendothelzellen mit Angiotensin II gezeigt, dass die Konzentration der Preproendothelin-1-mRNA dosis- und zeitabhängig ist. Nach 4h fiel die Konzentration wieder auf basale Level ab (Chua, Chua et al. 1993).

Da in dieser Arbeit statt kultivierter Endothelzellen Arteria mammaria interna-Segmente verwandt wurden, kann mit der Arbeit von Chua et al. (1993) kein direkter Vergleich durchgeführt werden. Es bleibt daher zu klären, ob Endothelzellen von kardiovaskulär erkrankten Patienten andere Eigenschaften bezüglich Stimulation durch Angiotensin II und Endothelin-Synthese als Gesunde haben, und inwieweit glatte Gefäßmuskelzellen zu diesem Effekt beitragen können.

5.3. Schlussfolgerung und Ausblick

Die beschriebenen und in dieser Arbeit gemessenen Interaktionen von Sauerstoffradikalen und Angiotensin II mit dem Endothelin-1-Metabolismus unterstützt die Beobachtungen vorangegangener Studien und trägt zum Verständnis der vasokonstriktorsichen Wirkung freier Radikale bei. Desweiteren erklären diese Ergebnisse auch, dass Sauerstoffradikale möglicherweise die lokale Endothelin-1-Wirkung aggravieren und die Progression atherosklerotischer Veränderungen unterstützen. Die Interaktionen dieser Substanzen scheinen komplex zu sein und eine mannigfaltige Auswirkung auf das lokale Geschehen pathologischer Veränderungen zu haben.

Klinische Relevanz erlangt Endothelin-1 vor allem durch seine vasokonstriktorsichen und nachgewiesenen mitogenen Eigenschaften. In dieser Hinsicht bestehen viele Ähnlichkeiten zum Angiotensin-System (Schiffrin 2002; Müller, Fiebeler et al. 2003). Zukünftig bleibt allerdings noch zu klären, inwieweit diese experimentell erhobenen Daten klinische Relevanz haben. Dies zu klären ist notwendig, um zu identifizieren, ob Ansätze zur therapeutischen Intervention durch den Einsatz von Antioxidantien oder Endothelin-Rezeptor-Antagonisten bestehen. Die spezifische Wirkung dieser Therapiemöglichkeiten konnte bereits gezeigt werden (Barton, Haudenschild et al. 1998; Nguyen, Cernacek et al. 1998).

In diesem Zusammenhang konnten Wenzel et al. (1998) darlegen, dass Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung von der Therapie mit dem unspezifischen ET-Rezeptor-Antagonisten Bosentan profitieren. So wurden sowohl der systolische Blutdruck als auch das LDL-Cholesterin gesenkt (Wenzel, Fleisch et al. 1998).

Diese Arbeit verdeutlicht damit den Zusammenhang von Superoxidanionen und Hydroxylanionen und deren steigernde Wirkung auf die Endothelin-1-Synthese in humanen Arteria mammaria interna ex vivo. Zusätzlich konnte der stimulierende Effekt des Angiotensin II auf den Endothelin-1-Metabolismus gezeigt werden. Zusammenfassend ergibt sich ein Hinweis zwischen der experimentellen Interaktion von Sauerstoffradikalen und Endothelin-1 und den beobachteten und beschriebenen erhöhten Endothelin-1-Spiegeln bei Hypertension und Hypercholesterinämie.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Endothelin-1 und Sauerstoffradikale sind Vasokonstriktoren, die kurzfristig den Gefäßtonus und langfristig die Gefäßwandphysiologie beeinflussen. ET-1 ist zudem proinflammatorisch, fördert die Entstehung von Fibrosen, hat mitogenes Potential und trägt entscheidend zum arteriellen Remodeling und zur Schädigung der Gefäße bei. Da Sauerstoffradikale und vasoaktive Substanzen wie ATII die Endothelin-1-Synthese sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* modulieren können, wurde deren Effekt auf humane Arteria mammaria interna *ex vivo* untersucht.

Methoden: Frische Arteria mammaria interna-Segmente wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Xanthin/Xanthinoxidase über 6h inkubiert. Die Quantifizierung des Endothelin-1 erfolgte durch semiquantitative Analyse der Fluoreszenzintensität anhand von histologischen Schnitten. Desweiteren wurden Arteria mammaria interna-Segmente mit Angiotensin II über 4h inkubiert. Die Quantifizierung der intrazellulären Endothelin-1-Konzentration wurde mit einem ELISA durchgeführt.

Ergebnisse: Unter oxidativem Stress stiegen die ET-1-Konzentration dosisabhängig signifikant ($p < 0,01$) an und wurden durch Koinkubation mit Radikalscavengern vollständig aufgehoben. Die Exposition gegenüber Angiotensin II führte zum Anstieg der intrazellulären ET-1-Konzentration auch noch 20h nach Inkubation. Die Effekte waren statistisch nicht signifikant.

Interpretation: Exogen applizierter oxidativer Stress führt zur Steigerung der ET-1-Synthese in humanen Arteria mammaria interna *ex vivo*. Dieser Effekt ist spezifisch für Superoxid- und Hydroxylanionen, da die Steigerung vollständig durch Radikalscavenger aufgehoben wird. Die ET-1-Synthese wird durch den Agonisten Angiotensin II stimuliert. Der Anstieg des ET-1 über die Stimulation hinaus ist am ehesten durch eine aktivierte Proteinbiosynthese erklärbar. Die Untersuchungen zeigen, dass die ET-1-Konzentrationen unter pathologischen Bedingungen, wie sie mit oxidativem Stress assoziiert sind, ansteigen.

7. Literaturverzeichnis

Abassi, Z. A., J. E. Tate, et al. (1992). "Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin." Hypertension **20**(1): 89-95.

Apostolopoulou, S. C., S. Rammos, et al. (2003). "Acute endothelin A receptor antagonism improves pulmonary and systemic haemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension that is primary or autoimmune and related to congenital heart disease." Heart **89**(10): 1221-6.

Arai, H., S. Hori, et al. (1990). "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor." Nature **348**(6303): 730-2.

Bagnato, A. and F. Spinella (2003). "Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis." Trends Endocrinol Metab **14**(1): 44-50.

Barton, M. (2000). "Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics." Curr Hypertens Rep **2**(1): 84-91.

Barton, M., C. C. Haudenschild, et al. (1998). "Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14367-72.

Battistini, B., P. Chailier, et al. (1993). "Growth regulatory properties of endothelins." Peptides **14**(2): 385-99.

Benigni, A. and G. Remuzzi (1997). "The renoprotective potential of endothelin receptor antagonists." Expert Opinion on Therapeutic Patents **7**(2): 139-149.

Bloch, K. D., C. C. Hong, et al. (1991). "cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2." Genomics **10**(1): 236-42.

Boarder, M. R. and D. B. Marriott (1989). "Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells." J Cardiovasc Pharmacol **13 Suppl 5**: S223-4.

Boulanger, C. and T. F. Luscher (1990). "Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide." J Clin Invest **85**(2): 587-90.

Bousette, N. and A. Giaid (2003). "Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies." Can J Physiol Pharmacol **81**(6): 578-87.

Busse, R., I. Fleming, et al. (1993). "Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation." Eur Heart J **14 Suppl I**: 2-9.

Cao, L. Q. and R. O. Banks (1990). "Cardiorenal actions of endothelin, Part I: Effects of converting enzyme inhibition." Life Sci **46**(8): 577-83.

Carrea, F. P., E. J. Lesnefsky, et al. (1991). "Reduction of canine myocardial infarct size by a diffusible reactive oxygen metabolite scavenger. Efficacy of dimethylthiourea given at the onset of reperfusion." Circ Res **68**(6): 1652-9.

Chua, B. H., C. C. Chua, et al. (1993). "Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells." Biochim Biophys Acta **1178**(2): 201-6.

Davis, A., K. Hogarth, et al. (2003). "Functional significance of protein kinase A activation by endothelin-1 and ATP: negative regulation of SRF-dependent gene expression by PKA." Cell Signal **15**(6): 597-604.

de Nucci, G., R. Thomas, et al. (1988). "Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9797-800.

Ding, Y., H. C. Gonick, et al. (2000). "Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells." Am J Hypertens **13**(5 Pt 1): 552-5.

Douglas, S. A., C. Louden, et al. (1994). "A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670." Circ Res **75**(1): 190-7.

Douglas, S. A., L. M. Vickery-Clark, et al. (1995). "Endothelin receptor subtypes in the pathogenesis of angioplasty-induced neointima formation in the rat: a comparison of selective ETA receptor antagonism and dual ETA/ETB receptor antagonism using BQ-123 and SB 209670." J Cardiovasc Pharmacol **26 Suppl 3**: S186-9.

Emori, T., Y. Hirata, et al. (1992). "Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell." Biochem Pharmacol **44**(12): 2409-11.

Fan, J., H. Unoki, et al. (2000). "Role of endothelin-1 in atherosclerosis." Ann N Y Acad Sci **902**: 84-93; discussion 93-4.

Fernandez-Patron, C., M. W. Radomski, et al. (1999). "Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor." Circ Res **85**(10): 906-11.

- Ferri, C., G. Desideri, et al. (1999). "Angiotensin II increases the release of endothelin-1 from human cultured endothelial cells but does not regulate its circulating levels." Clin Sci (Lond) **96**(3): 261-70.
- Filep, J. G., F. Herman, et al. (1991). "Antiaggregatory and hypotensive effects of endothelin-1 in beagle dogs: role for prostacyclin." J Cardiovasc Pharmacol **17 Suppl 7**: S216-8.
- Firth, J. D. and P. J. Ratcliffe (1992). "Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression." J Clin Invest **90**(3): 1023-31.
- Freay, A., A. Johns, et al. (1989). "Bradykinin and inositol 1,4,5-trisphosphate-stimulated calcium release from intracellular stores in cultured bovine endothelial cells." Pflugers Arch **414**(4): 377-84.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-6.
- Giaid, A., M. Yanagisawa, et al. (1993). "Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension." N Engl J Med **328**(24): 1732-9.
- Gorlach, A., R. P. Brandes, et al. (2000). "A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall." Circ Res **87**(1): 26-32.
- Griendling, K. K. and R. W. Alexander (1996). "Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances." Faseb J **10**(2): 283-92.
- Gryglewski, R. J., R. M. Palmer, et al. (1986). "Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor." Nature **320**(6061): 454-6.
- Hafizi, S., S. P. Allen, et al. (1999). "Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors." Atherosclerosis **146**(2): 351-9.
- Hassan, M., H. Kashimura, et al. (1997). "Gastric mucosal injury induced by local ischemia-reperfusion in rats. Role of endogenous endothelin-1 and free radical." Dig Dis Sci **42**(7): 1375-80.
- Hassoun, P. M., V. Thappa, et al. (1992). "Endothelin 1: mitogenic activity on pulmonary artery smooth muscle cells and release from hypoxic endothelial cells." Proc Soc Exp Biol Med **199**(2): 165-70.
- Hernandez-Perera, O., D. Perez-Sala, et al. (1998). "Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells." J Clin Invest **101**(12): 2711-9.

- Hickey, K. A., G. Rubanyi, et al. (1985). "Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells." Am J Physiol **248**(5 Pt 1): C550-6.
- Hirata, Y., T. Emori, et al. (1993). "Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells." J Clin Invest **91**(4): 1367-73.
- Hirata, Y., H. Yoshimi, et al. (1988). "Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells." FEBS Lett **239**(1): 13-7.
- Hofman, F. M., P. Chen, et al. (1998). "Endothelin-1 induces production of the neutrophil chemotactic factor interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells." Blood **92**(9): 3064-72.
- Imai, T., Y. Hirata, et al. (1992). "Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells." Hypertension **19**(6 Pt 2): 753-7.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2863-7.
- Ito, H., Y. Hirata, et al. (1991). "Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes." Circ Res **69**(1): 209-15.
- Jarasuniene, D. and A. Simaitis (2003). "[Oxidative stress and endothelial dysfunction]." Medicina (Kaunas) **39**(12): 1151-7.
- Kähler, J., B. Sill, et al. (2002). "Endothelin-1 mRNA and protein in vascular wall cells is increased by reactive oxygen species." Clin Sci (Lond) **103 Suppl 48**: 176S-178S.
- Kähler, J., A. Ewert, et al. (2001). "Oxidative stress increases endothelin-1 synthesis in human coronary artery smooth muscle cells." J Cardiovasc Pharmacol **38**(1): 49-57.
- Kähler, J., R. Koster, et al. (1997). "[Endothelins in cardiovascular diseases]." Z Kardiol **86**(6): 406-16.
- Kähler, J., S. Mendel, et al. (2000). "Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter." J Mol Cell Cardiol **32**(8): 1429-37.
- Katusic, Z. S., J. Schugel, et al. (1993). "Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery." Am J Physiol **264**(3 Pt 2): H859-64.
- Katusic, Z. S. and P. M. Vanhoutte (1989). "Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor." Am J Physiol **257**(1 Pt 2): H33-7.

- Kawaguchi, H., H. Sawa, et al. (1990). "Endothelin stimulates angiotensin I to angiotensin II conversion in cultured pulmonary artery endothelial cells." J Mol Cell Cardiol **22**(8): 839-42.
- Kimura, S., Y. Kasuya, et al. (1988). "Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety." Biochem Biophys Res Commun **156**(3): 1182-6.
- Kobayashi, T., T. Miyauchi, et al. (1998). "Endothelin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme in failing hearts of rats with myocardial infarction." J Cardiovasc Pharmacol **31** **Suppl 1**: S417-20.
- Kohan, D. E., E. Padilla, et al. (1993). "Endothelin B receptor mediates ET-1 effects on cAMP and PGE2 accumulation in rat IMCD." Am J Physiol **265**(5 Pt 2): F670-6.
- Leppaluoto, J. and H. Ruskoaho (1992). "Endothelin peptides: biological activities, cellular signalling and clinical significance." Ann Med **24**(3): 153-61.
- Lerman, A., B. S. Edwards, et al. (1991). "Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis." N Engl J Med **325**(14): 997-1001.
- Lesnefsky, E. J. (1994). "Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury." Adv Exp Med Biol **366**: 129-46.
- Liu, N., G. Chen, et al. (2003). "Effects of certain vasoactive peptides on pathogenesis of vascular restenosis." Chin Med Sci J **18**(1): 1-8.
- Love, G. P. and A. K. Keenan (1998). "Cytotoxicity-associated effects of reactive oxygen species on endothelin-1 secretion by pulmonary endothelial cells." Free Radic Biol Med **24**(9): 1437-45.
- Lüscher, T. F. (1989). "Endothelium-derived relaxing and contracting factors: potential role in coronary artery disease." Eur Heart J **10**(9): 847-57.
- Lüscher, T. F. (1994). "Endothelium in the control of vascular tone and growth: role of local mediators and mechanical forces." Blood Press Suppl **1**: 18-22.
- Lüscher, T. F. and M. Barton (2000). "Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs." Circulation **102**(19): 2434-40.
- Lüscher, T. F., Z. Yang, et al. (1990). "Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins." Circ Res **66**(4): 1088-94.
- MacCumber, M. W., C. A. Ross, et al. (1990). "Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(6): 2359-63.

- Maeda, S., T. Miyauchi, et al. (1998). "Prolonged exercise causes an increase in endothelin-1 production in the heart in rats." Am J Physiol **275**(6 Pt 2): H2105-12.
- Maguire, J. J., C. M. Johnson, et al. (1997). "Endothelin converting enzyme (ECE) activity in human vascular smooth muscle." Br J Pharmacol **122**(8): 1647-54.
- Malek, A. and S. Izumo (1992). "Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium." Am J Physiol **263**(2 Pt 1): C389-96.
- Margulies, K. B., F. L. Hildebrand, Jr., et al. (1990). "Increased endothelin in experimental heart failure." Circulation **82**(6): 2226-30.
- Marini, M., S. Carpi, et al. (1996). "Endothelin-1 induces increased fibronectin expression in human bronchial epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **220**(3): 896-9.
- Marsden, P. A., N. R. Danthuluri, et al. (1989). "Endothelin action on vascular smooth muscle involves inositol trisphosphate and calcium mobilization." Biochem Biophys Res Commun **158**(1): 86-93.
- Marzilli, M., S. Goldstein, et al. (1980). "Some clinical considerations regarding the relation of coronary vasospasm to coronary atherosclerosis: a hypothetical pathogenesis." Am J Cardiol **45**(4): 882-6.
- Masatsugu, K., H. Itoh, et al. (2003). "Shear stress attenuates endothelin and endothelin-converting enzyme expression through oxidative stress." Regul Pept **111**(1-3): 13-9.
- Maseri, A. (1984). "Spasm and dynamic coronary stenoses." J Cardiovasc Pharmacol **6 Suppl 4**: S683-90.
- Massai, L., P. Carbotti, et al. (2003). "Prepro-endothelin-1 mRNA and its mature peptide in human appendix." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **284**(2): G340-8.
- Matsuura, A., W. Yamochi, et al. (1998). "Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression." Hypertension **32**(1): 89-95.
- Maxwell, S. R. (2000). "Coronary artery disease--free radical damage, antioxidant protection and the role of homocysteine." Basic Res Cardiol **95 Suppl 1**: I65-71.
- McGraw-Hill (1999). "Cardiology - Clinical Medicine Series" McGraw-Hill International (UK) Ltd.: S. 325-6
- McMurray, J. J., S. G. Ray, et al. (1992). "Plasma endothelin in chronic heart failure." Circulation **85**(4): 1374-9.

- Miller, R. C., J. T. Pelton, et al. (1993). "Endothelins--from receptors to medicine." Trends Pharmacol Sci **14**(2): 54-60.
- Miller, W. L., M. M. Redfield, et al. (1989). "Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin." J Clin Invest **83**(1): 317-20.
- Minamino, T., H. Kurihara, et al. (1997). "Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis." Circulation **95**(1): 221-30.
- Miura, S., K. Saku, et al. (2003). "Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor." Hypertens Res **26**(12): 937-43.
- Miyauchi, T. and T. Masaki (1999). "Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system." Annu Rev Physiol **61**: 391-415.
- Momose, N., K. Fukuo, et al. (1993). "Captopril inhibits endothelin-1 secretion from endothelial cells through bradykinin." Hypertension **21**(6 Pt 2): 921-4.
- Moncada, S. and E. A. Higgs (1987). "Prostaglandins in the pathogenesis and prevention of vascular disease." Blood Rev **1**(2): 141-5.
- Moncada, S. and J. R. Vane (1980). "Interrelationships between prostacyclin and thromboxane A2." Ciba Found Symp **78**: 165-83.
- Moslen, M. T. (1994). "Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis." Adv Exp Med Biol **366**: 17-27.
- Müller, D. N., A. Fiebeler, et al. (2003). "Angiotensin II and endothelin induce inflammation and thereby promote hypertension-induced end-organ damage." Clin Nephrol **60 Suppl 1**: S2-12.
- Nakatani, T., S. Tanabe, et al. (2003). "Enhanced expression of endothelin-A receptor in human transplant renal arteriosclerosis." Int J Mol Med **11**(2): 153-6.
- Nath, K. A., S. K. Kanakiriya, et al. (2003). "Increased venous proinflammatory gene expression and intimal hyperplasia in an aorto-caval fistula model in the rat." Am J Pathol **162**(6): 2079-90.
- Nguyen, Q. T., P. Cernacek, et al. (1998). "Endothelin A receptor blockade causes adverse left ventricular remodeling but improves pulmonary artery pressure after infarction in the rat." Circulation **98**(21): 2323-30.

- O'Grady, J., S. Warrington, et al. (1980). "Effects of intravenous infusion of prostacyclin (PGI₂) in man." Prostaglandins **19**(2): 319-32.
- Ohara, Y., T. E. Peterson, et al. (1993). "Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production." J Clin Invest **91**(6): 2546-51.
- Ozawa, Y., T. Hasegawa, et al. (2003). "Effect of endothelin-1 (1-31) on the renal resistance vessels." J Med Invest **50**(1-2): 87-94.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." Nature **327**(6122): 524-6.
- Pentland, A. P. (1994). "Active oxygen mechanisms of UV inflammation." Adv Exp Med Biol **366**: 87-97.
- Pettit, A. I., R. K. Wong, et al. (2002). "Increased free radical production in hypertension due to increased expression of the NADPH oxidase subunit p22(phox) in lymphoblast cell lines." J Hypertens **20**(4): 677-83.
- Quaschnig, T., F. T. Ruschitzka, et al. (2000). "[Role of endothelium in the etiology and therapy of atherosclerosis]." Internist (Berl) **41**(4): 355-62.
- Redmond, E. M., P. A. Cahill, et al. (1996). "Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells." J Cell Physiol **166**(3): 469-79.
- Resink, T. J., A. W. Hahn, et al. (1990). "Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **168**(3): 1303-10.
- Rich, S. and V. V. McLaughlin (2003). "Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease." Circulation **108**(18): 2184-90.
- Richard, V. J., C. E. Murry, et al. (1990). "Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial reperfusion: therapeutic implications." Fundam Clin Pharmacol **4**(1): 85-103.
- Saijonmaa, O., A. Ristimaki, et al. (1990). "Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **173**(2): 514-20.
- Sakamoto, H., S. Sasaki, et al. (1990). "Production of endothelin-1 by rat cultured mesangial cells." Biochem Biophys Res Commun **169**(2): 462-8.

- Schiffrin, E. L. (2002). "Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression." Am J Hypertens **15**(10 Pt 2): 115S-122S.
- Schmidt, Thews (2000). "Physiologie des Menschen" Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York **28**. Auflage: S. 469, 532.
- Schweizer, A., O. Valdenaire, et al. (1997). "Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations." Biochem J **328 (Pt 3)**: 871-7.
- Seo, B., B. S. Oemar, et al. (1994). "Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels." Circulation **89**(3): 1203-8.
- Shiba, R., M. Yanagisawa, et al. (1989). "Elimination of intravenously injected endothelin-1 from the circulation of the rat." J Cardiovasc Pharmacol **13 Suppl 5**: S98-101; discussion S102.
- Shimada, K., M. Takahashi, et al. (1994). "Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells." J Biol Chem **269**(28): 18275-8.
- Shinmi, O., S. Kimura, et al. (1989). "Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain." Biochem Biophys Res Commun **164**(1): 587-93.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem **215**(2): 213-9.
- Simonson, M. S. and W. H. Herman (1993). "Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src." J Biol Chem **268**(13): 9347-57.
- Stewart, D. J., G. Kubac, et al. (1991). "Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **18**(1): 38-43.
- Stoyneva, Z., M. Lyapina, et al. (2003). "Current pathophysiological views on vibration-induced Raynaud's phenomenon." Cardiovasc Res **57**(3): 615-24.
- Tamirisa, P., W. H. Frishman, et al. (1995). "Endothelin and endothelin antagonism: roles in cardiovascular health and disease." Am Heart J **130**(3 Pt 1): 601-10.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2003). "Role of endothelin in human hypertension." Can J Physiol Pharmacol **81**(6): 533-41.

- Trochu, J. N., J. B. Bouhour, et al. (2000). "Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of cardiac oxygen metabolism: implications in health and disease." Circ Res **87**(12): 1108-17.
- Turner, A. J. and K. Tanzawa (1997). "Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX." Faseb J **11**(5): 355-64.
- Valdenaire, O., D. Lepailleur-Enouf, et al. (1999). "A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization." Eur J Biochem **264**(2): 341-9.
- Vanhoutte, P. M. (1988). "Vascular endothelium and Ca²⁺ antagonists." J Cardiovasc Pharmacol **12 Suppl 6**: S21-8.
- Vanhoutte, P. M., W. Auch-Schwelk, et al. (1989). "Does endothelin-1 mediate endothelium-dependent contractions during anoxia?" J Cardiovasc Pharmacol **13 Suppl 5**: S124-8; discussion S142.
- Wang, X., S. A. Douglas, et al. (1996). "Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat." Circ Res **78**(2): 322-8.
- Ward, P. A., G. O. Till, et al. (1983). "Evidence for role of hydroxyl radical in complement and neutrophil-dependent tissue injury." J Clin Invest **72**(3): 789-801.
- Watanabe, T., S. Koba, et al. (2002). "Lysophosphatidylcholine potentiates the mitogenic effect of various vasoactive compounds on rabbit aortic smooth muscle cells." Jpn Heart J **43**(4): 409-16.
- Weckmüller, J., J. Kähler, (1998). "Oxidativer Stress steigert die Endothelin-1 mRNA-Synthese und reduziert die Endothelin-1-Spiegel." Dissertation: 5.
- Wei, C. M., A. Lerman, et al. (1994). "Endothelin in human congestive heart failure." Circulation **89**(4): 1580-6.
- Weidinger, F. F., J. M. McLenachan, et al. (1991). "Hypercholesterolemia enhances macrophage recruitment and dysfunction of regenerated endothelium after balloon injury of the rabbit iliac artery." Circulation **84**(2): 755-67.
- Wenzel, R. R., M. Fleisch, et al. (1998). "Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease." Circulation **98**(21): 2235-40.
- Wypij, D. M., J. S. Nichols, et al. (1992). "Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung." Biochem Pharmacol **43**(4): 845-53.

- Xu, D., N. Emoto, et al. (1994). "ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1." Cell **78**(3): 473-85.
- Yamauchi, Y., E. Kurosaki, et al. (2002). "[Pathophysiological role of endothelin-1 in the vascular remodeling process]." Nippon Yakurigaku Zasshi **120**(1): 79P-81P.
- Yanagisawa, M., A. Inoue, et al. (1988). "Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(18): 6964-7.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-5.
- Yokokawa, K., M. Kohno, et al. (1993). "Effect of heparin on endothelin-1 production by cultured human endothelial cells." J Cardiovasc Pharmacol **22 Suppl 8**: S46-8.
- Yokokawa, K., H. Tahara, et al. (1993). "Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells." J Clin Invest **92**(4): 2080-5.
- Yoshimoto, S., Y. Ishizaki, et al. (1991). "Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells." Stroke **22**(3): 378-83.
- Yoshizumi, M., H. Kurihara, et al. (1990). "Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **166**(1): 324-9.
- Yu, J. C. and A. P. Davenport (1995). "Secretion of endothelin-1 and endothelin-3 by human cultured vascular smooth muscle cells." Br J Pharmacol **114**(2): 551-7.
- Zeidan, A., J. Broman, et al. (2003). "Cholesterol dependence of vascular ERK1/2 activation and growth in response to stretch: role of endothelin-1." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(9): 1528-34.
- Zeiber, A. M., H. Goebel, et al. (1995). "Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina." Circulation **91**(4): 941-7.

8. Tabellen- & Abbildungsverzeichnis**1. Abbildungen**

Abbildung		Seite
1	Aminosäuresequenz des Endothelin-1 (ET-1 ₍₁₋₂₁₎)	9
2	Vaskuläre Effekte des ET-1	11
3	Vorrichtung zur Präparation der Arterie	24
4	Präparation einer Arterie	24
5	Wasserbad für Inkubation	25
6	Druckflasche mit Carbogen	25
7	Präzisionswaage (Kern 372)	26
8	Inkubationsanordnung	28
9	Kryotom	30
10	Homogenisator	36
11	Prinzip ELISA	37
12	Big-Endothelin & anti-Big-Endothelin-Antikörper	37
13	Kontrollgefäß (40x)/ Hämalaun	42
14	Stimulation mit 10 U/l XO (40x)/ Hämalaun	42
15	Stimulation mit 10 U/l XO (100x)/ Hämalaun	43
16	Stimulation mit 10 U/l XO (600x)/ Hämalaun	43
17	Kontrollgefäß (40x)/ Peroxidase	44
18	Stimulation mit 10 U/l XO (40x)/ Peroxidase	44
19	Stimulation mit 10 U/l XO (100x)/ Peroxidase	45
20	Kontrollgefäß (200x)/ ABC-AP	46
21	Stimulation mit 10 U/l XO (200x)/ ABC-AP	46
22	Kontrollgefäß (200x)/ ABC-AP	47
23	Stimulation mit 10 U/l XO (200x)/ ABC-AP	47
24	Kontrollgefäß (200x)/ CyTM	48
25	Stimulation mit 5 U/l XO (200x)/ CyTM	49
26	Stimulation mit 10 U/l XO (200x)/ CyTM	49
27	Stimulation mit 5 U/l XO (400x)/ CyTM	50
28	Stimulation mit 5 U/l XO (1000x)/ CyTM	50
29	α -Smooth Muscle Actin (100x)	51
30	Big-Endothelin-1 (100x)	51
31	Fluoreszenzintensitäten der Proben A1-5	58
32	Stimulation mit Angiotensin II Probe B1-3	61
33	Zeitlicher Verlauf der Stimulation mit Angiotensin II	62

2. Tabellen

Tabelle		Seite
1	Probegruppe A	22
2	Probegruppe B	23
3	Fluoreszenzintensitäten für Probe A 1	52
4	Fluoreszenzintensitäten für Probe A 2	53
5	Fluoreszenzintensitäten für Probe A 3	54
6	Fluoreszenzintensitäten für Probe A 4	55
7	Fluoreszenzintensitäten für Probe A 5	56
8	Zusammenfassung der Fluoreszenzintensitäten der Pr.A 1-5	57
9	Big-Endothelinkonz. in fmol/mg der Kontrollen (B 1-3) /1	59
10	Big-Endothelinkonz. in fmol/mg der Proben (B 1-3) /2	60

9. Abkürzungsverzeichnis

ABC	= Avidin-Biotin-Complex
ANP	= Atriales Natriuretisches Peptid
AP	= Alkalische Phosphatase
apoE-KO	= Apolipoprotein E-Knockout
AS	= Aminosäure
AT II	= Angiotensin II
bFGF-2	= Basic Fibroblast Growth Factor-2
°C	= Grad Celsius
CaCl ₂	= Kalziumchlorid
Cat	= Catalase
CHAOS	= Cambridge Heart Antioxidant Study
cGMP	= zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CO ₂	= Kohlenstoff-Dioxid
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
EDRF	= Endothelium Derived Relaxation Factor
EDTA	= Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGF	= Epidermal Growth Factor
ELISA	= Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
ET-1	= Endothelin-1
h	= Stunde
H ₂ O	= aqua
H ₂ O ₂	= Wasserstoff-Peroxid
HCl	= Salzsäure
HEPES	= (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonic acid])
HDL	= High Density Lipoprotein
HOPE	= Heart Outcomes Prevention Study
ICAM-1	= Intracellular Adhesion Molecule-1
IgG	= Immunglobulin G

IL-1	= Interleukin-1
KCl	= Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	= Kaliumhydrogenphosphat
l	= Liter
LDL	= Low Density Lipoprotein
LOX	= Lectin-Like oxidized LDL-Rezeptor
MCP-1	= Monocyte Chemoattractant Protein-1
MgSO ₄	= Magnesiumsulfat
mg	= Milligramm
min	= Minute
µl	= Mikroliter
ml	= Milliliter
mmol	= Millimolar
mRNA	= messenger Ribonukleinsäure
msec	= Millisekunden
NaCl	= Natriumchlorid
NADPHox	= Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase
NaHCO ₃	= Natriumhydrogenkarbonat
Na ₂ HPO ₄	= Natriumhydrogenphosphat
NaOH	= Natriumhydroxid
NO	= Nitric Oxide (Stickstoff-Monoxid)
NOS	= Nitric Oxide Synthase
O ₂	= Sauerstoff
ONOO ₂	= Peroxynitrit
oxLDL	= oxidized Low Density Lipoprotein
PAH	= Pulmonary Artery Hypertension
PAI-1	= Plasminogen Activator Inhibitor-1
PBS	= Phosphat Buffered Saline
PDGF	= Platelet Derived Growth Factor
RAAS	= Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rpm	= rotations per minute

RT	= Raumtemperatur
SEM	= Standard Error of Mean
s.o.	= siehe oben
SOD	= Superoxiddismutase
TGF- β	= Thrombin Growth Factor
TGF- β 1	= Transforming Growth Factor- β 1
TNF- α	= Tumor-Necrosis-Factor- α
Tris	= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	= Units
VCAM-1	= Vascular Cell Adhaesion Molecule-1
VEC	= Vascular Endothelial Cell
VEGF	= Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	= Vascular Smooth Muscle Cell
XO	= Xanthin-Oxidase

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. T. Meinertz danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertationsarbeit an seiner Klinik durchführen zu können und an sein Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Reichenspurner danke ich für die sehr gute Kooperation und Zusammenarbeit, die die Durchführung der Experimente dieser Arbeit ermöglichte.

Herrn PD Dr. med. J. Kähler danke ich für die Überlassung des Themas, für die tatkräftige Unterstützung und die zahlreichen Anregungen und Hilfen. Aber nicht nur die wissenschaftliche Betreuung hat mir sehr geholfen, sondern die freundliche Unterstützung und Motivation haben entscheidend zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen.

Zu großer Dankbarkeit bin ich meiner Freundin, Dorit Knappe, verpflichtet. Durch ein offenes Ohr und viel Geduld hat sie mich bei der Beendigung dieser Dissertation maßgeblich unterstützt.

Bei meiner Familie möchte ich mich für ihr Verständnis und Hilfe bedanken, ohne die mir diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke auch recht herzlich all denjenigen, die mir bei der Erstellung der Dissertation mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Sill
Vorname: Björn
Geburtsdatum: 14.03.1977
Geburtsort: Stralsund
Wohnort: Eppendorfer Landstraße 90, 20249 Hamburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983 – 1991 Grundschole Neukloster
1991 – 1996 Gymnasium Neukloster
1994 – 1995 Stanhope Elmore High School Millbrook, Alabama
1996 Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

07/1996 – 08/1997 REHA-Zentrum Neukloster

Hochschulbildung:

04/1998 – 06/2004 Universität Hamburg, Studiengang: Humanmedizin
03/2000 Ärztliche Vorprüfung
03/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

05/2000 – 06/2002 Internistische Forschung
Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie
Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. T. Meinertz

Ärztliche Tätigkeit:

09/2004 – jetzt Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Universitätsklinikum Rostock
Direktor: Prof. Dr. G. Steinhoff

12. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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 an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ort, Datum

Unterschrift