

Universitäres Herzzentrum
Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. T. Meinertz

**Wirkung von Sauerstoffradikalen und Angiotensin II auf die
Endothelin-1 Synthese in humanen Arteria mammaria interna
Segmenten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Dorit Knappe

aus Hagenow

Hamburg Sommer 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Diese Arbeit widme ich meinen Großeltern Hilde Knappe,
Annemarie und Ernst Wilke

INHALTSVERZEICHNIS

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG.....	4
2. EINLEITUNG.....	5
2.1. Hintergrund.....	5
2.2. Endothel und Arteriosklerose.....	6
2.3. Endothelin.....	8
2.3.1. Allgemeines zum Endothelin.....	8
2.3.2. Struktur und Metabolismus der Endotheline.....	8
2.3.3. Regulierung und Sekretion der Endotheline.....	10
2.3.4. Pathophysiologische Bedeutung der Endotheline.....	14
2.4. Oxidativer Stress.....	18
2.4.1. Reaktive Sauerstoffspezies.....	18
2.4.2. Xanthinoxidase.....	19
2.4.3. NAD(P)H Oxidase.....	20
2.4.4. Bedeutung von oxidativem Stress.....	20
2.4.5. Interaktion von ROS mit Endothelin-1.....	21
2.5. Angiotensin II.....	22
2.5.1. Das Renin-Angiotensin-System.....	22
2.5.2. Intrazelluläre Signaltransduktion von Angiotensin II.....	24
2.5.3. Pathophysiologische Bedeutung des Renin-Angiotensin Systems.....	25
2.5.4. Angiotensin und ROS Produktion.....	28
2.6. Angiotensin-Endothelin Interaktion.....	29
3. MATERIAL UND METHODIK.....	31
3.1. Studien an Arteria mammaria interna Segmenten.....	31
3.1.1. Patientencharakteristika.....	31
3.1.2. Entnahme und Präparation der Gefäße.....	31
3.1.3. Inkubation.....	33
3.2. Studien mit Blutproben von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie.....	37
3.2.1. Studienprotokoll.....	37
3.2.2. Dosierung und Therapiedauer.....	38

3.2.3.	Durchführung.....	39
3.3.	Quantitative Bestimmung der Big Endothelin-1 Proteinkonzentration.	40
3.3.1.	Prinzip des Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA).....	41
3.3.2.	Versuchsdurchführung.....	42
3.3.3.	Messung der Extinktion und Erstellung der Kalibrationsgeraden..	42
3.4.	Statistische Auswertung.....	43
3.5.	Verwendete Materialien.....	43
3.5.1.	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme.....	43
3.5.2.	Zusammensetzung verwendeter Lösungen.....	44
4.	ERGEBNISSE.....	45
4.1.	Studien an humanen Arteria mammaria interna Segmenten.....	45
4.1.1.	Effekt von Xanthin/Xanthinoxidase auf die intrazelluläre Big Endothelin-1 Protein Konzentration.....	45
4.1.2.	Wirkung von Radikalscavengern auf die Big ET-1 Konzentration.	47
4.1.3.	Wirkung von Angiotensin II auf die Big ET-1 Synthese.....	48
4.1.4.	Effekt von Radikalscavengern auf die AT II stimulierte Big Endothelin-1 Synthese.....	50
4.2.	Studie mit Seren von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie Wirkung von Oxypurinol auf die Big-Endothelin-1 Synthese.....	51
5.	DISKUSSION.....	53
5.1.	Effekte von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Big-ET-1 Konzentration in IMA Segmenten.....	54
5.2.	Effekte von Angiotensin II auf die Big ET-1 Konzentration in IMA Segmenten.....	56
5.3.	Effekte von Oxypurinol auf die Big ET-1 Konzentration im Serum von Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie.....	57
5.4.	Interaktionen von AT II, Oxidativem Stress und der Endothelin-1 Expression.....	59
5.4.1.	ET-1 Modulation durch RAS.....	62
5.4.2.	RAS Modulation durch ET-1 Produktion.....	63
5.4.3.	Kombination von ETRA und Inhibitoren des RAS.....	64
5.5.	Bedeutung der Interaktionen für kardiovaskuläre Erkrankungen.....	65
5.5.1.	Arterielle Hypertonie.....	65

5.5.2. Gefäßremodeling.....	66
5.6. Zusammenfassende und weiterführende Aspekte.....	67
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	70
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	71
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	84
9. DANKSAGUNG.....	87
10. LEBENSLAUF.....	88
11. ERKLÄRUNG.....	89

1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Endothelin-1 ist ein vasokonstriktorisches Peptid mit proliferativen und mitogenen Eigenschaften. Bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion oder manifester Atherosklerose sind die Konzentrationen von Endothelin-1 in den Gefäßen intramural und intravasal deutlich erhöht. Auch Sauerstoffradikale werden unter diesen Bedingungen vermehrt synthetisiert. Zusammen mit Endothelin beschleunigen sie den Progress der Atherosklerose. Angiotensin II fördert diesen Mechanismus durch Steigerung der Sauerstoffradikalsynthese, während der Vasodilatator Stickstoffmonoxid durch die Reaktion mit Sauerstoffradikalen inaktiviert wird.

Bisher konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Inkubation von Endothelzellen und Gefäßwandmyozyten mit Xanthin/Xanthinoxidase oder Wasserstoffperoxid zu einer deutlichen und anhaltenden Steigerung der Endothelin-1 Proteinkonzentration führt. Die Relevanz dieser in vitro erhobenen Befunde wurde in ersten Experimenten an explantierten Arteria mammaria interna Segmenten immunhistologisch verifiziert.

In den für die Promotionsarbeit vorgesehenen Experimenten soll nach Stimulation von Arteria mammaria interna Segmenten die Endothelin-1 Konzentration quantitativ bestimmt werden, um die Wechselwirkung zwischen Angiotensin II - Radikale - Antioxidantien - Endothelin-1 genau zu charakterisieren.

2. EINLEITUNG

2.1. Hintergrund

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Risikofaktoren für die Entwicklung atherogener Veränderungen der Gefäße sind Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus. Sie führen zu einer Schädigung der strukturellen und funktionellen Integrität der Gefäßwände [1].

Die zentralen zellulären Komponenten der lokalen Regulationsmechanismen der Gefäße stellen die Endothelzellen und glatten Muskelzellen dar. Besonders das Endothel dient als autokrin/parakrines Organ der Synthese von zahlreichen Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, vasoaktiven Substanzen und proinflammatorischen Zytokinen. Es reguliert die lokale Hämostase, die Leukozytenaktivierung und proliferative Prozesse innerhalb der Gefäßwand. Das Endothel spielt als zellulärer und hormonaler Mediator zwischen der Zirkulation und der Muskelschicht eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus. Als Vasokonstriktoren agieren hierbei vor allem das autokrin/parakrin wirkende Endothelin-1 (ET-1) sowie das Angiotensin II (AT II). Andere endothelial synthetisierte Substanzen wirken rezeptorvermittelt als Vasodilantien, darunter Stickstoffmonoxid (NO) sowie Prostazyklin [2].

Die vasoaktiven Substanzen weisen untereinander und mit einer Reihe im Blut zirkulierender Substanzen, wie Bradykinin, biogene Amine und Adeninnukleotiden, komplexe metabolische Interaktionen auf. Bei intaktem Gefäßendothel besteht ein Übergewicht der Faktoren, welche die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen hemmen. Eine Dysbalance der vaskulären Regulationsmechanismen fördert durch ein Ungleichgewicht zugunsten der vasokonstriktiven, adhäsiven und proliferativen Transmitter die Entwicklung pathologischer Prozesse [3].

2.2. Endothel und Arteriosklerose

Das Endothel bildet die innerste Schicht der Blutgefäße und stellt ein wichtiges autokrin/parakrines Organ dar, welches den Gefäßtonus, die lokale Hämostase und die Proliferation reguliert. Dies erfolgt durch eine Freisetzung vasodilatativer (Stickstoffmonoxid, Prostazyklin, endothelium-derived hyperpolarizing factor) und vasokonstriktorischer Substanzen (Endothelin-1, Angiotensin II, Thromboxan A₂, freie Radikale) als Antwort auf physiologische Stimulantien [4-7]. Die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität ist entscheidend für die Bewahrung des Blutflusses und der Prävention der Thrombose [5].

Viele kardiovaskuläre Erkrankungen entstehen aufgrund einer Dysbalance zwischen den vasoaktiven Substanzen. Ein Beispiel dafür ist die Ausbildung der Arteriosklerose. Sie ist gekennzeichnet durch die Akkumulation von veresterten Cholesterolen, extrazellulärer Matrix und Blutbestandteilen in der Gefäßintima [8]. Es existieren zahlreiche Beweise dafür, dass die endotheliale Dysfunktion ein wichtiger Faktor ist, welcher zur Arteriosklerose und dem akuten Koronarsyndrom führt [9, 10].

Endotheliale Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion wird über eine verminderte Synthese, Freisetzung und/oder Aktivität des Endothel-abhängigen Stickstoffmonoxid erklärt. Der Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) in den arteriosklerotisch veränderten Gefäßen führt zu einer beeinträchtigten Gefäßrelaxation [11, 12], gesteigerten Plättchenaggregation [13], verstärkter Proliferation der glatten Muskelzellen [14] und erhöhten Leukozytenadhäsion am Endothel [15, 16]. Die endotheliale Dysfunktion ist wahrscheinlich ebenso zurückzuführen auf die abnormale und exzessive Freisetzung von vasokonstriktorisches Substanzen wie ET-1 [17]. Tatsächlich zeigte sich bei Patienten mit fortgeschrittener Arteriosklerose und akutem Koronarsyndrom eine gesteigerte Konzentration von zirkulierendem und gewebsständigem immunreaktivem ET-1 [18, 19]. Die gestörte Vasomotorik und die strukturellen Umbauvorgänge innerhalb der Gefäßwände fördern das weitere Fortschreiten des atherogenen Prozesses. Zahlreiche Studien demonstrierten, dass die endotheliale Dysfunktion eine der

frühen Manifestationen der Arteriosklerose darstellt [20-22]. Eine endotheliale Dysfunktion ist charakteristisch für Patienten mit kardialen Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus. Bei Untersuchungen an Patienten mit einer milden koronaren Herzkrankheit (KHK) und endothelialer Dysfunktion, verglichen mit Patienten mit besserer Endothelfunktion, zeigten diese eine größere Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen [23]. Weitere Studien belegten, dass eine endotheliale Dysfunktion, bei Patienten mit angiografisch normalen Koronararterien, prädispositioniert für ein späteres kardiovaskuläres Ereignis [24]. Die Bewertung der endothelialen Funktion stellt damit eine prognostische Information dar [25, 26]. Der Mechanismus der endothelialen Dysfunktion scheint multifaktoriellen Ursprungs zu sein. Es gibt eine steigende Evidenz, dass Anstiege der Produktion von freien Radikalen zu diesem Phänomen beisteuern (s. Abb. 2.1).

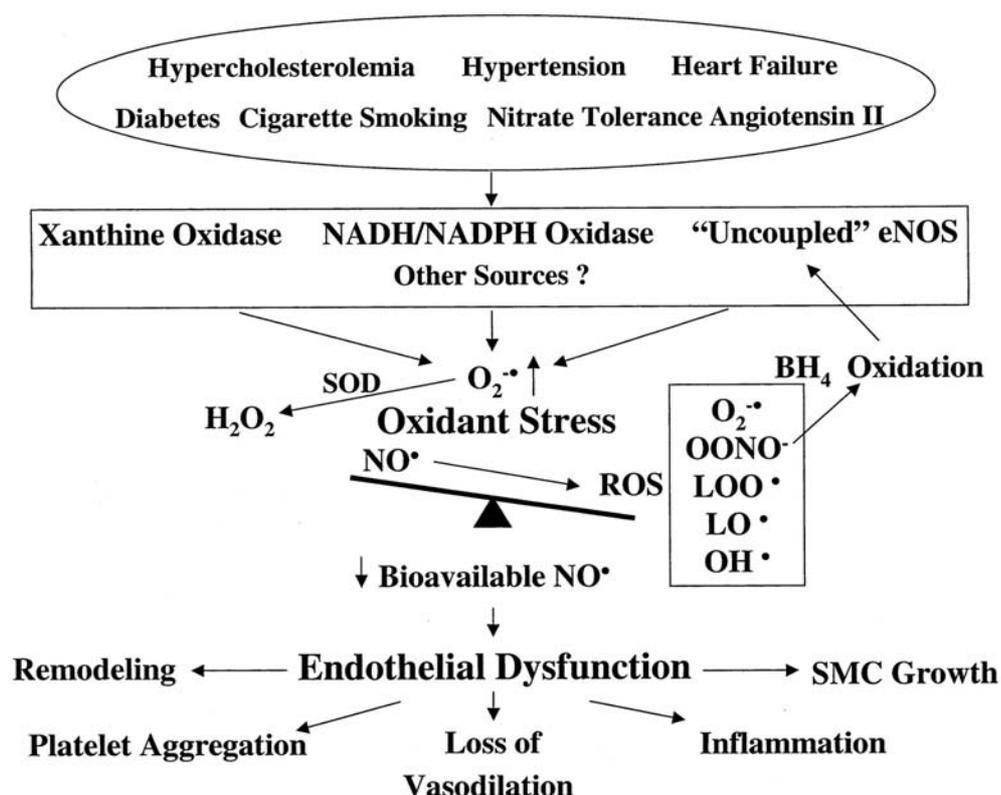


Abbildung 2.1: Mechanismus der durch oxidativen Stress induzierten endothelialen Dysfunktion in kardiovaskulären Erkrankungen [27].

2.3. Endothelin

2.3.1. Allgemeines zum Endothelin

Die Entdeckung des Endothelins vor mehr als 15 Jahren hat zu einem starken, bis heute unvermindert anhaltenden internationalen Interesse an dieser Substanz und dem damit verbundenen physiologischen Regulationssystem geführt. Die ersten Hinweise auf die Existenz des Endothelins ergaben sich im Rahmen von Experimenten, welche die Rolle des Endothels als stoffwechselaktives Organ untersuchten.

Eine vasokonstriktorische Substanz, die in Endothelzellen produziert wird und einen Einfluss auf die Koronararterien besitzt, wurde erstmals 1985 beschrieben [28]. Die Familie der Endotheline wurde darauf 1988 von Yanagisawa isoliert und identifiziert. Die drei Mitglieder, Endothelin-1, Endothelin-2 und Endothelin-3, werden in einer Vielzahl von Geweben gebildet, wo sie als Modulatoren des Gefäßtonus, der Zellproliferation und Hormonproduktion agieren [29]. Zahlreiche Studien mit den Endothelinen und ihren spezifischen Rezeptorantagonisten lassen vermuten, dass diese Peptide eine große Rolle in den Gefäßen und deren Erkrankungen spielen [30-32].

2.3.2. Struktur und Metabolismus der Endotheline

Endothelin-1

Endothelin-1 ist ein 21-Aminosäurepeptid, welches 1988 als potenter Vasokonstriktor identifiziert wurde [29]. Endothelin-1 (ET-1) ist das am besten untersuchte Familienmitglied der 3 Peptide. Es wird vorwiegend von den Endothelzellen [33] und Gefäßwandmyozyten [34] produziert, aber auch von Neuronen, Hepatozyten, Mesangium-, Endometrium- und Brustepithelzellen sowie Makrophagen [35, 36]. ET-1 ist ein autokrines/parakrines Peptidhormon, welches mit anderen vasoaktiven Substanzen interagiert und zusätzlich zur hohen vasokonstriktorischen Potenz eine proliferationsinduzierte Eigenschaft besitzt. Wichtige Stimulantien zur

Induktion der Transkription der Endothelin-1 messenger RNA (mRNA) sind Hypoxie, Ischämie oder Scherstress (s. Abb.2.2).

Die Synthese und Sekretion von Endothelin-1 erfolgt innerhalb von Minuten. Die Halbwertszeit des Endothelin-1 beträgt 4-7 Minuten [37]. Im Plasma wird es zu 80-90 % bei der ersten Passage durch die Lunge abgebaut [38]. Mehr als 75 % der Endothelin-1 Sekretion von den Endothelzellen erfolgt zur Seite der glatten Muskelzellen (abluminal) [39, 40]. Dort bindet es an spezifische Rezeptoren auf den Muskelzellen und vermittelt die Vasokonstriktion. Jedoch zeigte sich, dass auch die Plasma-Endothelin-Konzentrationen nützliche Parameter darstellen. Sie korrelieren z.B. gut mit der Schwere der Herzinsuffizienz und haben wahrscheinlich einen prognostischen sowie diagnostischen Wert [41].

Die Injektion von ET-1 systemisch führt initial zu einem kurzen Intervall von Hypotension gefolgt von einer langanhaltenden Steigerung des Blutdrucks [42]. Zusätzlich zum blutdrucksteigernden Effekt reguliert ET-1 das Zellwachstum (Hypertrophie), die Zellproliferation und hat einen Einfluss auf die Apoptose [43-45].

Endothelin-2 und Endothelin-3

Zwei zusätzliche menschliche Endothelin-Isoformen, Endothelin-2 und Endothelin-3, welche von unterschiedlichen Genen kodiert werden, konnten isoliert werden [46]. Endothelin-2 wird hauptsächlich in der Niere und im Darm gebildet, mit kleinen Anteilen im Myokard, in der Plazenta und im Uterus. Ebenso wie das Endothelin-1 zirkuliert auch das Endothelin-3 im Plasma. Seine genaue Quelle ist jedoch unbekannt. Es konnte in hohen Konzentrationen im Gehirn gefunden werden und reguliert wahrscheinlich wichtige Funktionen der Neurone und Astrozytome [47]. ET-3 wurde ebenfalls im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge und in der Niere gefunden.

2.3.3. Regulierung und Sekretion der Endotheline

Jedes Endothelin ist ein Produkt eines separaten Genes, welches für ein großes Vorläuferprotein kodiert. Das menschliche Endothelin-1 Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert [48]. Die Promoterregion hat typische CAAT und TATA Sequenzen, welche die Transkription regulieren und damit eine regulatorische Stelle für wichtige Stimulantien bereithalten. Durch diese und andere Promotorstellen können eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Proteinen die Transkription des Endothelin-1 Genes modulieren [49].

Die drei Peptide ET-1, -2 und -3 bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren mit zwei Disulfidbrücken. ET-2 und -3 unterscheiden sich durch den Austausch von zwei bzw. sechs Aminosäuren vom ET-1. Das ET-1 wird über eine aus 212 Aminosäuren bestehende Vorstufe, dem Präproendothelin, synthetisiert. Durch proteolytische Spaltung entsteht daraus das 38 Aminosäuren enthaltene Big Endothelin-1. Die zweite Spaltung erfolgt durch das ET-Konversion-Enzym (ECE), einer spezifischen Endopeptidase [50]. Es trennt das Big ET-1 zwischen der Position 21 (Tryptophan) und 22 (Valin) zum Endothelin-1. Das ECE ist durch die Proteaseinhibitoren Phosphoramidon und Pepstatin inhibierbar [51]. Einige endogene Substanzen sind bekannte Stimulatoren der ET Produktion, wie Thrombin, Transforming growth factor β (TGF β), Tumornekrosefaktor α , Immunglobulin-1, Insulin, Angiotensin II, Bradykinin und Norepinephrin [33] (s. Abb.2.2). Im Kontrast dazu sind Stickstoffmonoxid, atriale natriuretische Peptid, Prostacyclin und Heparin bekannte Inhibitoren der ET Produktion [33, 52].

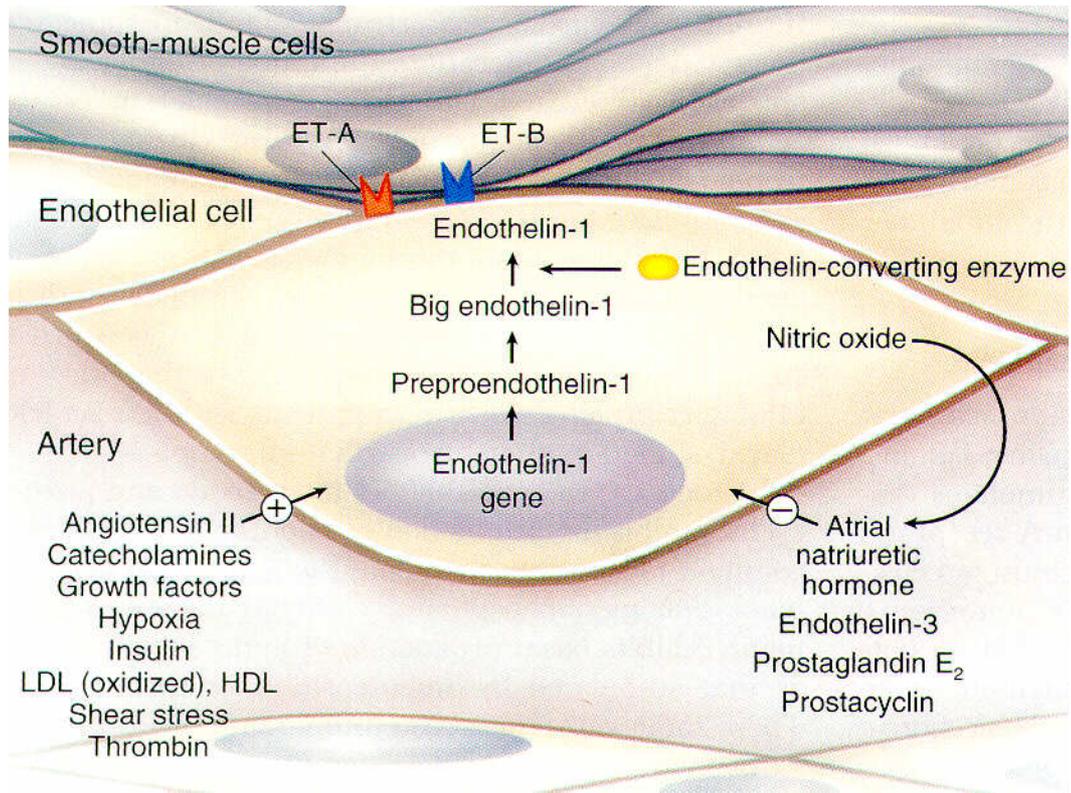


Abbildung 2.2: Regulation, Verarbeitung und Sekretion von Endothelin-1 in Endothelzellen: Hormone und vaskuläre Faktoren modulieren die Synthese des Präproendothelin-1 durch Regulation der Bindung von Transkriptionsfaktoren, wie GATA-2 und AP-1 an spezifischen Elementen am Endothelin-1 Gen Promoter. Die mRNA wird übersetzt in ein 212-Aminosäuren Präproendothelin, welches dann umgewandelt wird in ein 38-Aminosäuren Prohormon, Big Endothelin. Das Endothelin Converting Enzyme baut das Big Endothelin-1 zu einem 21 Aminosäuren Endothelin-1 Protein um [49].

Endothelin Rezeptoren

Alle drei Endotheline binden an 2 Typen von Rezeptoren (A und B). Sie gehören zur Familie der G-Protein vermittelten Rezeptoren, die aus sieben transmembranären Domänen bestehen [53, 54]. ET-A Rezeptoren haben eine 10fach höhere Affinität für ET-1 als für ET-3 und finden sich vorwiegend auf Herz- und Gefäßwandmyozyten [54]. Die Rezeptoren vermitteln die Vasokonstriktion des ET-1. Die Vasokonstriktion erfolgt über die Stimulation der Phospholipase C, die zu einer Bildung von Inositol 1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol führt (s. Abb.2.3). Die Steigerung des Inositol 1,4,5-triphosphat resultiert in einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, die darauf in einer Vasokonstriktion endet. Die Aktivierung der Proteinkinase C führt langfristig zur Steigerung der Zellproliferation und –hypertrophie.

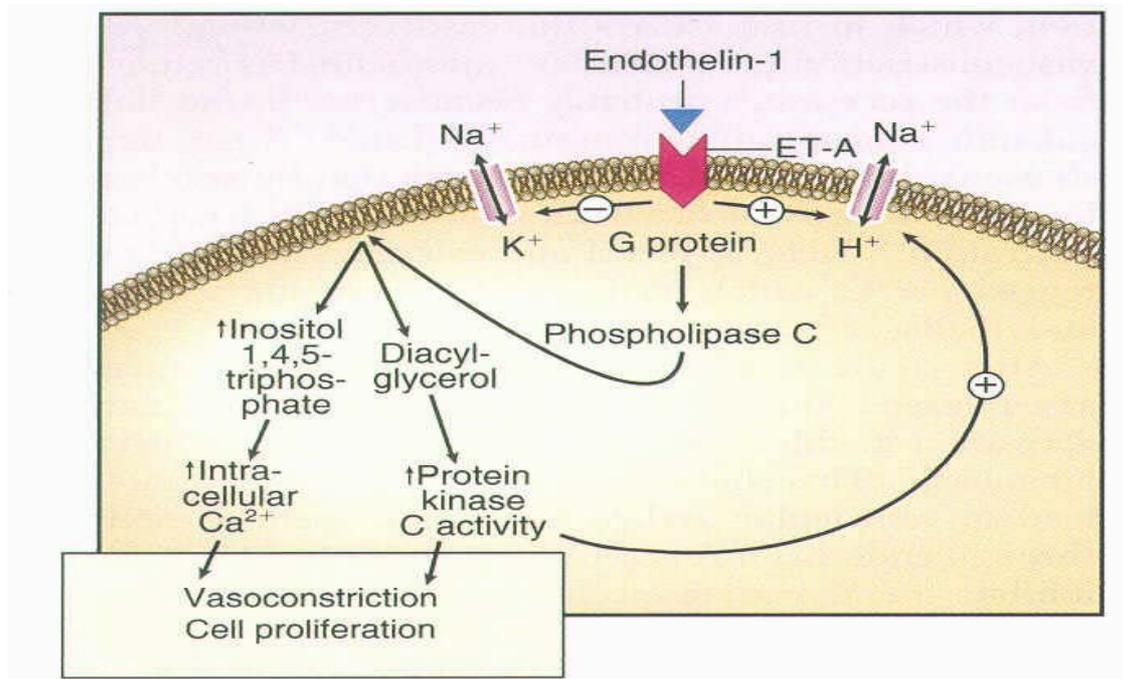


Abbildung 2.3: Signaltransduktion der Endothelin-A Rezeptoren: Die aktivierten ET-A-Rezeptoren stimulieren über einen G-Protein-gekoppelten Signaltransduktionsweg die Hydrolyse von Phospholipase C. Dieses führt zu einem Anstieg von Inositoltriphosphat und Diacylglycerol. Inositoltriphosphat führt zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern. Die von Diacylglycerol und Ca^{2+} aktivierte Proteinkinase C sensitiviert den kontraktile Apparat und führt langfristig zu einer Zellproliferation. Das freigesetzte Calcium führt zur Kontraktion der Muskelzellen [49].

Die ET-B Rezeptoren finden sich vorwiegend auf Endothelzellen und haben eine gleich hohe Affinität für ET-1 und ET-3. Die Signaltransduktion der ET-B Rezeptoren erfolgt über die gleichen Transmitter wie bei den ET-A Rezeptoren. Eine Kopplung von ET-B an inhibitorische G-Proteine kann zu einer Modifizierung der Wirkung führen. Dieses erfolgt wahrscheinlich über die Inhibierung der Bildung von zyklischem AMP (cAMP) [55]. ET-B Rezeptoren auf den Endothelzellen sind verantwortlich für die Freisetzung der vom Endothel abstammenden Relaxationsfaktoren, wie Stickstoffmonoxid und Prostazyklin, die zu einer Vasodilation führen [56, 57].

Neben den Endothelin-Spiegel beeinflussen auch die Rezeptorzahl und das Verhältnis zwischen ET-A und ET-B Rezeptoren die gewebsspezifischen Effekte. Die Regulation der Produktion der Rezeptoren erfolgt durch die gleichen Mechanismen wie die der Endothelinsynthese. Die ET-A Rezeptorsynthese wird durch Hypoxie, zyklisches AMP und Wachstumsfaktoren gesteigert, während AT II und Platelet-derived growth factor zur Abnahme der Synthese führen [58]. Die Synthese der ET-B Rezeptoren wird durch das atriale natriuretische Peptid (ANP) und AT II gesteigert, im Kontrast dazu durch cAMP und Katecholaminen verringert [59].

2.3.4. Pathophysiologische Bedeutung der Endotheline

Die Familie der Endotheline ist bei einer Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen von potentieller Bedeutung. Im nachfolgenden Abschnitt wird auf die Rolle der Endotheline bei häufig vorkommenden kardiovaskulären Erkrankungen eingegangen.

Tabelle 1: Potentielle Relevanz von Endothelin-1 in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen [59].

<u>Höchstwahrscheinlich</u>	<u>Wahrscheinlich</u>
Herzinsuffizienz	Ductus Botalli
Pulmonale Hypertonie	Re-Stenose nach PTA
Arterielle Hypertonie	Vasospastische Angina
Arteriosklerose	M. Raynaud
Myokardinfarkt	
Cyclosporin-induzierte Hypertonie	
Postischämisches Nierenversagen	

Endotheline bei Herzinsuffizienz

Die Serum Endothelin und Big Endothelin Konzentrationen sind bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz 2-4 fach erhöht. Die Endothelin-1 Spiegel korrelieren dabei direkt positiv mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung und dem linksventrikulären enddiastolischen Druck, jedoch invers mit der Auswurffraktion und der maximalen Belastbarkeit [60, 61]. Die gute Korrelation der Serum ET-1 Spiegel mit der Prognose der Herzinsuffizienz deutet auf eine wichtige Rolle in Pathophysiologie der Erkrankung hin. Die Ursache der erhöhten Endothelin-1 Spiegel ist nur teilweise bekannt. Hypoxie, Scherstress und Hormone, die assoziiert sind mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, stimulieren möglicherweise die Endothelin Synthese und führen damit zu einer kurzfristigen Stabilisierung des systemarteriellen Druckes. Jedoch führt eine langfristige Erhöhung der ET-1 Spiegel durch die Induktion von vaskulärer Hypertrophie, myokardialer Umbauvorgänge und Flüssigkeitsretention zu einer Progression der Herzinsuffizienz (s. Abb. 2.4).

Die Erkenntnisse der Rolle der Endotheline versprechen viele Möglichkeiten für Therapieansätze. In Untersuchungen am Menschen zeigte sich eine Reduktion von arteriellen Mitteldruck, pulmonalkapillären Druck sowie systemischen und pulmonalen Gefäßwiderstand nach einer Behandlung mit Bosentan, einem gemischten ET-A und ET-B Inhibitor [62].

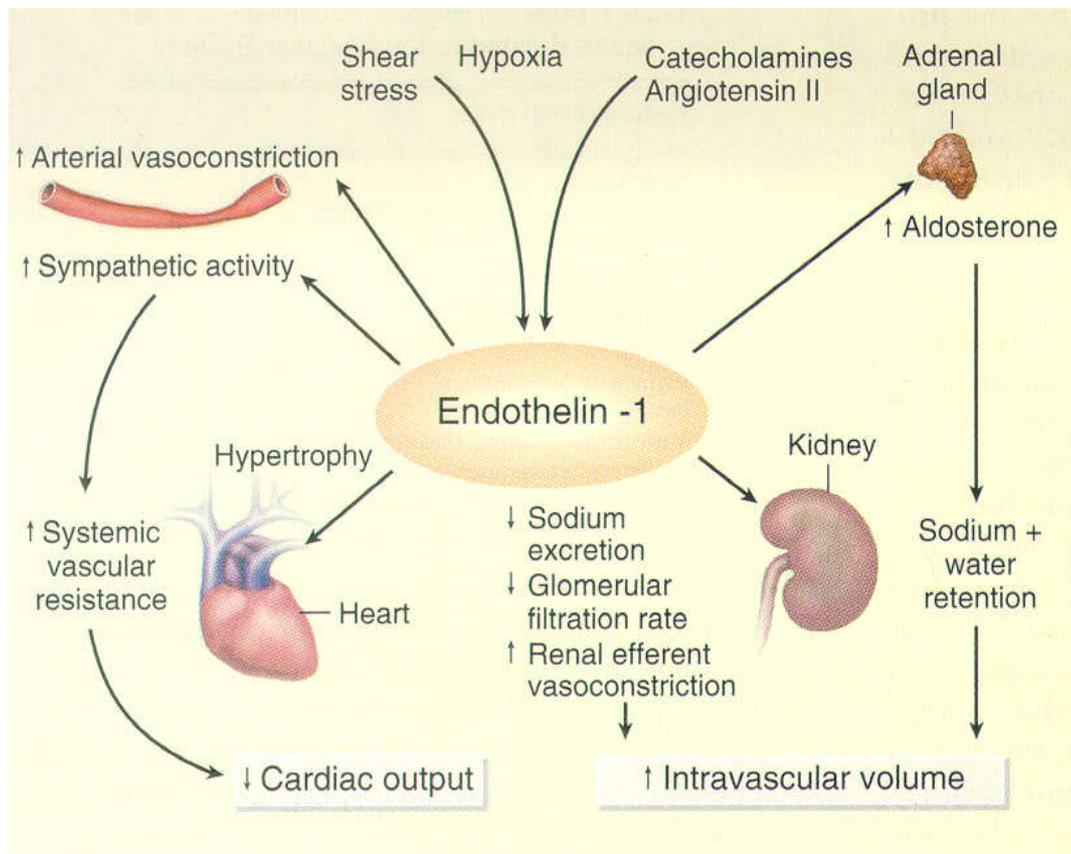


Abbildung 2.4: Endothelin-1 bei Herzinsuffizienz: Hypoxie, Scherstress und verschiedene Hormone stimulieren die Endothelin-1 Produktion. ET-1 stimuliert die Aldosteronsekretion und senkt die Nierenperfusion. Beides führt zu einer Retention von Natrium und Wasser und steigert das intravasale Volumen. ET-1 stimuliert ebenso die Hypertrophie von Myokardmyozyten, steigert die Sympathikusaktivität und arterielle Vasokonstriktion. Ein erhöhter peripherer Widerstand senkt das Herzminutenvolumen [49].

Endotheline bei arterieller Hypertonie

In Untersuchungen an verschiedenen Hypertoniemodellen und Patienten mit mäßiger Hypertonie wurden normale oder nur gering erhöhte ET-1 Serumspiegel nachgewiesen [63, 64]. Die gemessenen ET-1 Konzentrationen waren deutlich niedriger als diejenigen, die für systemische ET-1 Effekte notwendig wären [65]. Die Rolle der Endotheline bei der arteriellen Hypertonie ist daher komplexer als angenommen und damit die Hoffnung einen kausal verantwortlichen Mediator gefunden zu haben, zu einfach zu sein. Jedoch gibt es Evidenzen dafür, dass die Endotheline eine Rolle in der Entwicklung der arteriellen Hypertonie spielen. Da die ET-1 Freisetzung durch das Endothel vorwiegend abluminal stattfindet, reflektieren die gemessenen ET-1 Spiegel lediglich indirekt die lokalen ET-1 Konzentrationen und sprechen damit nicht gegen die pathogenetische Bedeutung für die Entstehung der arteriellen Hypertonie [40]. Wahrscheinlich kommt es in einem gewissen Umfang zu einer Adaptation an veränderte Endothelin-1 Spiegel. Die zentrale Größe ist dafür offenbar die reduzierte Dichte der ET-Rezeptoren [66]. Die Arbeitsgruppe von Deng zeigte, dass eine antihypertensive Therapie zu einer Zunahme der ET-Rezeptordichte führte [67].

Eine weitere Rolle in der Entstehung der arteriellen Hypertonie spielt das Renin-Angiotensin-System (RAS). Bei der arteriellen Hypertonie kommt es zu einer erhöhten Ausschüttung von ET-1 durch Stimulation mit AT II. In Tiermodellen und am Menschen führte eine Reduktion des arteriellen Druckes mit ACE Inhibitoren zu einer Normalisierung der ET-1 Reaktivität [67]. Studien mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten führten am Tiermodell zu einer kurzfristigen Reduktion des Blutdruck, langfristig blieb ein Effekt auf das vaskuläre Remodelling aus [68].

Zurzeit ist es noch nicht erwiesen, ob erhöhte ET-Spiegel eine kausale Rolle in der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie spielen. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass sie zu einer Aggravation des pathologischen Gefäßremodeling in der arteriellen Hypertonie beitragen.

Endotheline bei Arteriosklerose und instabiler Angina pectoris

Eine ausgeprägte Arteriosklerose führt zu einem Anstieg der Serum-Endothelin-1-Spiegel, welche gut mit der Schwere der atherosklerotischen Läsion korrelieren. Dieser beobachtete Effekt könnte durch die endotheliale Dysfunktion bedingt sein [18]. Bei einer instabilen Angina pectoris kommt es im Gegensatz zur stabilen Angina pectoris zu einem Anstieg der ET-1-Synthese. Diese ist wahrscheinlich durch die Freisetzung von Thrombin zu erklären. Durch die erhöhten ET-1 Spiegel kann es zum komplizierenden Vasospasmus kommen [69].

Endotheline bei Myokardinfarkt

Bei transmuralen Infarkten konnte eine Erhöhung der ET-1 Plasmaspiegel beobachtet werden [70]. Ursächlich kann dafür die Hypoxie oder die Ischämie sein, die beide zu einer gesteigerten Synthese von ET-1 führen. Die ET-1 Konzentrationen korrelieren gut mit der Einschränkung der linksventrikulären Funktion [71]. Bei einem Infarkt können erhöhte ET-1 Spiegel eine Ausdehnung des Infarktareals verursachen [29]. Auf diese Erkenntnis aufbauend zeigte Watanabe mit seiner Arbeitsgruppe, dass die Gabe eines ET-Antikörpers zu einer Reduktion der Infarktgröße um ein Drittel führt [72]. Dieser Mechanismus lässt sich einerseits über die durch ET-1 induzierte Vasokonstriktion und damit Verschlechterung der Perfusion erklären, sowie andererseits durch eine ET-1 verursachte Steigerung der Nachlast und dem damit verbundenen größeren myokardialen Sauerstoffverbrauches.

2.4. Oxidativer Stress

2.4.1. Reaktive Sauerstoffspezies

Der oxidative Stress ist eine Konsequenz der oxidierenden Eigenschaft der freien Radikale. Freie Radikale sind Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte (freie) Elektronen besitzen. Ein ungepaartes Elektronenpaar belegt dabei ein Orbital allein. Den Sauerstoffradikalen gilt ein besonderes Interesse.

Der für die Energiegewinnung notwendige Sauerstoffmetabolismus in biologischen Systemen ist mit der Formierung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS), wie z. B. Wasserstoffperoxid und den anionischen Hydroxyl- und Superoxidradikalen verbunden. ROS sind Moleküle, die initial vom Sauerstoff abstammen, aber eine univalente Reduktion vollzogen haben und so bereitwillig mit anderen biologischen Produkten reagieren. Die ROS sind involviert in Mechanismen wie Zellwachstum, Hypertrophie, Apoptose, endothelialen Adhäsion und spielen eine Rolle in der Pathophysiologie von Diabetes, Hypertonie, Atherosklerose und Herzinsuffizienz.

Die ROS beinhalten Superoxidradikale ($\cdot\text{O}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$), Stickstoffmonoxid (NO) und das NO/ $\cdot\text{O}_2^-$ Reaktionsprodukt Peroxynitrit (ONOO^-). Der Hauptproduktionsort für Superoxidanionen sind die Ubiquinone der Mitochondrien. Weitere potentielle enzymatische Quellen von ROS stellen die Enzyme des Arachidonsäuremetabolismus Lipooxygenase und Cyclooxygenase, Cytochrom p450, Xanthinoxidase, NAD(P)H Oxidase, NO Synthase und Peroxidasen dar [27, 73].

Im Gegensatz zu $\cdot\text{O}_2^-$ sind NO, H_2O_2 , ONOO^- keine freien Radikale per se, besitzen jedoch oxidative Eigenschaften, welche deutlich zum oxidativen Stress beitragen. Das Superoxid $\cdot\text{O}_2^-$ dismutiert spontan oder wird durch die Superoxiddismutase (SOD) in das stabilere Radikal H_2O_2 umgewandelt. Katalase und Gluthationperoxidase sind wichtige Scavenger von H_2O_2 und führen zur Formation von Wasser und Sauerstoff [74-76]. Signifikant schneller als die Reaktion mit SOD verläuft die bimolekulare Reaktion von NO mit $\cdot\text{O}_2^-$. Dies resultiert in der Bildung von Per-

oxynitrit (ONOO^-) und damit zu einer verringerten Bioverfügbarkeit des Vasodilators NO.

Das Superoxidanion hat viele verschiedene Effekte, einerseits direkt oder indirekt durch die Generierung von anderen Radikalen, wie das H_2O_2 und ONOO^- . Die Effekte beinhalten: 1. die rapide Inaktivierung der potenten Signalmoleküle und des Endothelium derived relaxing factor (EDRF) NO, das zur endothelialen Dysfunktion führt; 2. die Vermittlung der Signaltransduktion mit einer veränderten Gentranskription und Protein- sowie Enzymaktivität; und 3. oxidativer Schaden an Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten, DNA und Zellsystemen [77].

2.4.2. Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidoreduktase ist ein Molybdänenzym, welches zur Katalysierung der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin im Purinstoffwechsel fähig ist. Sie existiert in zwei konvertierbaren Formen: Xanthindehydrogenase oder Xanthinoxidase (XO). Die erstgenannte reduziert das Nicotinamidadenindinucleotid (NAD^+), wobei die Xanthinoxidase den molekularen Sauerstoff bevorzugt und zu einer Produktion von $\bullet\text{O}_2^-$ und H_2O_2 führt. Die XO ist eine bedeutende Quelle für die Produktion von ROS in den Endothelzellen und wird mit der endothelialen Dysfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht.

Eine gesteigerte Xanthinoxidase-Aktivität und die damit verbundene erhöhte Superoxidanionenproduktion wurde in Gefäßen von starken Rauchern [78], von Patienten mit einer KHK [79], Hypercholesterinämie [80] und bei Ischämie/Reperfusionsschäden beobachtet [81]. Studien haben gezeigt, dass frühe Stadien der Arteriosklerose, verursacht durch eine nahrungsinduzierte Hypercholesterinämie, assoziiert sind mit einer gesteigerten Superoxidanionenproduktion. Die Gabe von Oxypurinol konnte die $\bullet\text{O}_2^-$ Produktion normalisieren und die endotheliale Dysfunktion verbessern, was eine Involvierung der Xanthinoxidase möglich macht [82].

2.4.3. NAD(P)H Oxidase

Viele Studien haben die NAD(P)H Oxidase als eine bedeutende Quelle von ROS in Gefäßen beschrieben [83-86]. Die NAD(P)H Oxidase besteht aus multiplen Untereinheiten (p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} und gp91^{phox}) [87] und konnte sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen gefunden werden. Die Aktivität der Oxidase kann durch verschiedene Substanzen gesteigert werden, besonders hervorzuheben ist dabei die Stimulation durch das Angiotensin II. Die chronische Infusion von AT II steigert die NAD(P)H Expression und ROS Produktion, was in einem erhöhten Blutdruck und einer eingeschränkten endothelialen Vasodilatation resultiert [84, 88].

2.4.4. Bedeutung von oxidativem Stress

Die reaktiven Sauerstoffspezies sind an der kurzfristigen Regulation des Gefäßtonus und an langfristigen Strukturveränderungen innerhalb der Gefäßwände beteiligt. Es konnte eine erhöhte Sauerstoffradikalproduktion in porcinen Koronararterienwänden nach Verletzung durch eine Angioplastie nachgewiesen werden. Antioxidativ wirkende Vitamine, wie z. B. C, E und ProbucoI, bewirkten eine Reduktion der neointimalen Proliferation bei einer arteriellen Gefäßwandverletzung [89, 90].

Freie Sauerstoffradikale wirken über komplexe Mechanismen toxisch. Die Reaktion von ROS mit ungesättigten Fettsäuren resultiert in einer Störung der Zellmembranpermeabilität, die zu einer beeinträchtigten Hämostase sowie Rezeptorfunktion führt [91]. Reaktive Sauerstoffspezies, abgesehen von ihrer Kapazität Schäden an Zellen und Geweben zu induzieren, können die endotheliale Funktion beeinträchtigen [26] und sind assoziiert mit einem gesteigerten Blutdruck [92]. In mehreren Studien an Gefäßsegmenten wurden durch ROS vermittelte vasokonstriktorische Effekte beschrieben [93, 94]. Ursächlich dafür können eine durch oxidativen Stress modulierte zelluläre Kalziumhämostase [95, 96], eine Reduktion der Bioverfügbarkeit von NO [96] oder auch eine Stimulation der Transkription der Endothelin-1 Synthese sein.

Die ROS fördern ebenfalls das Zellwachstum und spielen eine wichtige Rolle im vaskulären Remodeling [97]. Über Veränderungen der nukleären Gentranskription könnte langfristig die Regulation von Apoptose und Hypertrophie beeinflusst werden. Die Modulation der proliferationsbezogenen Signaltransduktion kann auf redox-sensitive MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren zurückgeführt werden [91].

2.4.5. Interaktion von ROS mit Endothelin-1

Wie im Abschnitt 2.3.4. beschrieben, wurden in zahlreichen Studien bei kardiovaskulären Erkrankungen erhöhte Endothelin-1 Konzentrationen nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe von Hassan zeigte eine gesteigerte gastrale Endothelin-1 Konzentration nach artifizieller Ischämie der Arteria gastrica sinistra. Die ET-1 Spiegel konnten durch Zusatz von Bosentan oder SOD und CAT reduziert werden [98]. Zieht man die bereits erwähnten Interaktionen zwischen ROS und ET-1 sowie die Ähnlichkeiten der induzierten Vasokonstriktion und Zellproliferation in Betracht, ist es wahrscheinlich, dass die ROS eng verbunden sind mit der Produktion und der Signalwirkung von ET-1. Das ET-1 und die ROS begünstigen durch ihr mitogenes und proliferations-induzierendes Potential die Progression atherosklerotischer Veränderungen. Sauerstoffradikale wirken zusätzlich als funktionelle Agonisten der Endotheline und verstärken daher vasomotorische Regulationsstörungen bei atherogenen Prozessen.

Die Interaktionen von ROS und dem Endothelin-1 Metabolismus sind von besonderem pathophysiologischem Interesse, aber noch nicht geklärt. Die Behandlung von menschlichen Aorta- und glatten Muskelzellen der Koronarien mit Hydrogenperoxid oder Xanthin/Hypoxanthin Oxidase steigerte die ET-1 Synthese [99]. Diese gesteigerte Regulation der ET-1 Produktion durch oxidativen Stress wurde ebenfalls in Endothelzellen beobachtet [100]. Sauerstoffradikale könnten dabei potentiell durch die Aktivierung von Proteinkinasen der MAP-Kinasen-Familie oder durch Induktion von spezifischen Transkriptionsfaktoren die Expression des ET-1 Genes beeinflussen. Weiterhin ist bekannt, dass ROS den nukleären Faktor (NF κ B) aktivieren kann [101], welcher einen stimulierenden Einfluss auf die Präproendothelin-Expression hat [102]. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass oxidativer Stress die ET-1 Synthese durch Aktivierung des Endothelin-1 Promotors steigerte und

das ROS eine Steigerung der Präproendothelin-1 mRNA bewirken [99, 103]. Frühere Studien zu den Interaktionen von ROS mit Endothelin-1 zeigten widersprüchliche Ergebnisse [104-106]. Die Effekte von freien Sauerstoffradikalen auf den Endothelin-1 Metabolismus sind daher noch nicht weitreichend erklärt.

2.5. Angiotensin II

2.5.1. Das Renin-Angiotensin-System

Das systemische Renin-Angiotensin-System (RAS) hat einen wichtigen Anteil an der Kurz- als auch Langzeitregulation des arteriellen Blutdruckes, sowie an der Regulierung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes und der Gewebeproliferation. Die Entdeckung des RAS begann vor mehr als 100 Jahren, als Tigerstedt und Bergman erstmals eine Pressorsubstanz aus der Nierenrinde nachweisen konnten [107]. Page und Helmer zeigten 1940, dass nicht Renin selbst eine Pressorsubstanz ist, sondern sie beschrieben den Zusammenhang von Renin und Angiotensin [108].

Nach heutigem Kenntnisstand über das RAS fasst man zusammen, dass Angiotensin in Form einer inaktiven Vorstufe, dem Angiotensinogen, synthetisiert wird. Unter dem Einfluß von Renin wird das Angiotensin I gebildet. Angiotensin I wird schließlich über das Angiotensin-Konversions-Enzym in Angiotensin II überführt (s. Abb.2.5). Das Angiotensin II wirkt über zellmembranständige Rezeptoren an den Zielzellen und wird innerhalb weniger Sekunden durch unspezifische Proteasen zum einen in inaktive, zum anderen in weiter aktive Fragmente wie Angiotensin III und Angiotensin IV gespalten.

Neben dem klassischen endokrinen System, bei dem alle Komponenten des RAS und seiner Produkte in der Blutbahn zu ihren Zielorganen zirkulieren, sind in den letzten Jahre lokale RAS in diversen Organen (z.B. Herz, Niere, Gefäßen, Nebenniere, Gehirn, Plazenta, Testis und Fettgewebe) beschrieben worden [109]. Das Angiotensin II ist daher vornehmlich als ein lokalwirkendes vasoaktives Peptid anzusehen [110]. Je nach Lokalisation der RAS Komponenten wird zwischen systemischen und lokalen Systemen unterschieden. Es ist bekannt, dass das ACE auf

der Oberfläche von Endothelzellen im gesamten Blutkreislauf präsent ist. Daher erfolgt die Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II wahrscheinlich hauptsächlich an der Oberfläche der Blutgefäße [111, 112]. Die physiologische Bedeutung lokaler RAS, in dem alle Komponenten von der lokalen Expression des Renin-, Angiotensinogen- und ACE Gens stammen [113], ist noch ungeklärt.

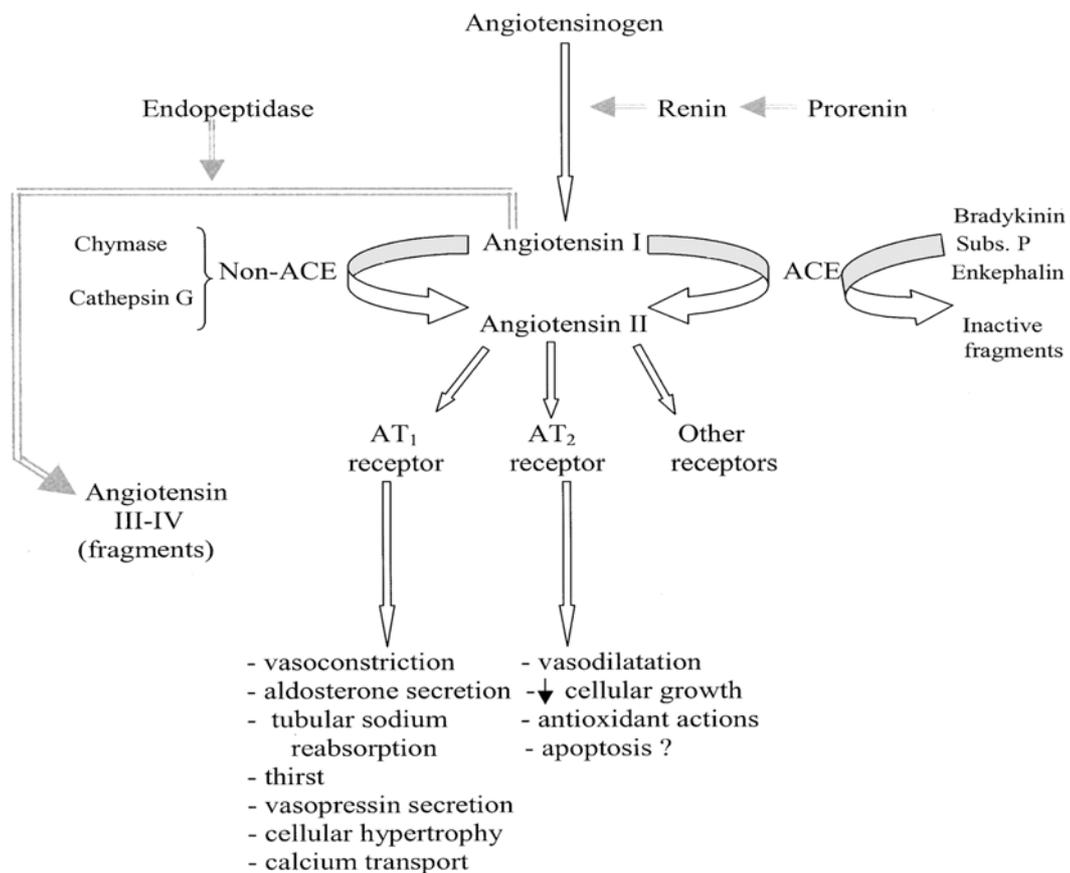


Abbildung 2.5: Die enzymatische Proteinkaskade des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und seine Funktionen: Das proteolytische Enzym Renin spaltet aus dem Angiotensinogen, welches in der Leber synthetisiert wird, das Angiotensin I ab. Dieses wird dann durch das ACE, das größtenteils an der luminalen Oberfläche des Endothels lokalisiert ist, in das Angiotensin II umgewandelt. AT II ist das biologisch aktive Peptid, welches durch spezifische Bindung an verschiedenen Rezeptoren die Effekte an Herz, Gefäßen, Niere und anderen vermittelt. Es besteht eine höhere Affinität zum AT₁ Rezeptor als zum AT₂ Rezeptor [114].

2.5.2. Intrazelluläre Signaltransduktion von Angiotensin II

Die Effekte von AT II werden über spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt. Dies erfolgt hauptsächlich über die zwei Subtypen des Angiotensin II Rezeptors (AT_1 und AT_2) und in geringer Anzahl über den AT_3 und AT_4 Rezeptor [115]. Unter normalen Umständen werden AT_1 Rezeptoren im Vergleich zu AT_2 Rezeptoren vermehrt expremiert. Die beiden Rezeptoren vermitteln gegensätzliche Effekte auf das Wachstum und Remodeling (s. Abb. 2.5). Die spezifische Rolle des AT_2 Rezeptors in der Pathophysiologie von Erkrankungen ist wenig beschrieben, die meisten Funktionen des AT II werden über den AT_1 Rezeptor vermittelt.

Der AT_1 Rezeptor gehört zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird auf einer Vielzahl von Geweben expremiert, wie Herz, Gehirn, Niere, Lunge und besonders auf glatten Muskelzellen. Abhängig vom Gewebe resultiert die Stimulation der Signaltransduktion in einer Kontraktion, Hypertrophie, Proliferation und/oder Apoptose [110]. Die Bindung von AT II an den AT_1 Rezeptor führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C und Inhibierung der Adenylatzyklase. Die aktivierte Phospholipase C resultiert in einer vermehrten Bildung von Inositoltriphosphat und Diazylglyzerol. Das Inositoltriphosphat wirkt am endoplasmatischen Retikulum und erhöht so die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Diazylglyzerol und freies Kalzium aktivieren die Proteinkinase C, welche einen stimulierenden Einfluss auf die Transkription und Translation der DNA im Nukleus hat. Durch die vermehrte Synthese von Strukturproteine und Wachstumsfaktoren kommt es zur Stimulation des Zellwachstums.

2.5.3. Pathophysiologische Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems

Die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems spielt eine große Rolle in der Pathophysiologie und Progression von verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen. Das RAS ist involviert in Prozessen der ventrikulären Hypertrophie bei der arteriellen Hypertonie, der Gefäßhypertrophie und –hyperplasie in der Arteriosklerose und beim strukturellen und funktionellen Remodeling der Niere bei der chronischen Niereninsuffizienz. Speziell das AT II spielt bei den genannten Krankheiten eine Schlüsselrolle.

Das AT II ist der nach Endothelin-1 stärkste bekannte Vasokonstriktor. Die Produktion von AT II in der Arterienwand ist bedeutend für die Regulation des Tonus der Arterie, und sie ist klar involviert in der Pathogenese der Arteriosklerose. In humanen atherosklerotischen Läsionen konnte eine gesteigerte Aktivität des lokalen RAS, mit erhöhten Spiegeln an ACE, AT II und AT₁ Rezeptoren, festgestellt werden [116]. Das AT II erhöht den Gefäßtonus mittels einer Bindung an die auf der Oberfläche der glatten Muskelzellen lokalisierten AT₁ Rezeptoren, welche in einer sofortigen Kontraktion resultiert [117]. Neben den kurzfristigen pressorischen Effekten besitzt AT II auch eine langsam eintretende blutdrucksteigernde Wirkung, was von besonderer klinischer Bedeutung ist. Das AT II hat neben der Blutdruckregulation weitere Effekte auf die Volumen- und Elektrolythomöostase. Es erhöht die Sekretion und Plasmakonzentration von Aldosteron, das eine Veränderung des Salzhaushaltes bewirkt. Daneben übt AT II einen direkten Einfluss auf die nierenständigen AT II Rezeptoren aus und kann über eine Veränderungen des renalen Blutflusses und des glomerulären Filtrationsdruckes den Wasser- und Elektrolythaushalt modifizieren [118]. Für die molekularen Effekte von AT II hat man zeigen können, dass AT II mitogen wirkt und insbesondere das Wachstum von glatten Muskelzellen in Gefäßwänden stimuliert [119]. Dies wird vermutlich über die parakrinen Aktionen vom TGFβ und Endothelin-1 vermittelt [120].

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Untersuchungen zum Einfluss von AT II auf die Produktion und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen. Dieser Mechanismus, welcher selektiv über den AT₁ Rezeptor vermittelt wird, spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Arteriosklerose und degenerativen Prozes-

sen in kardiovaskulären und renalen Erkrankungen. Die Abbildung 2.6 zeigt wie der über den AT₁ Rezeptor vermittelte oxidative Stress mittels komplexer Aktionen zur Plaqueformation, endothelialen Dysfunktion und Thrombose beiträgt. AT II fördert die Aktivierung und Adhäsion von Monozyten an den Endothelzellen, die Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen, die Bildung freier Radikale, die Akkumulation von oxidiertem LDL und die Bildung von Schaumzellen. Des Weiteren steigert es die Proliferation, die Migration und Matrixproduktion von glatten Muskelzellen. Im weiteren Verlauf trägt AT II über die Stimulation von Metalloproteasen zur Plaqueruptur bei. Es hat sich in der Vergangenheit gezeigt, dass die Inhibierung des RAS durch ACE-Hemmer oder AT II Rezeptor Antagonisten eine Vielzahl von positiven Effekten, in Bezug auf Endorganschäden und Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen, bereithält. Ein gesicherter Vorteil durch den Einsatz von Inhibitoren des RAS konnte bei Patienten mit Hypertonie, akutem Myokardinfarkt, linksventrikulärer Dysfunktion, Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankheit festgestellt werden [114].

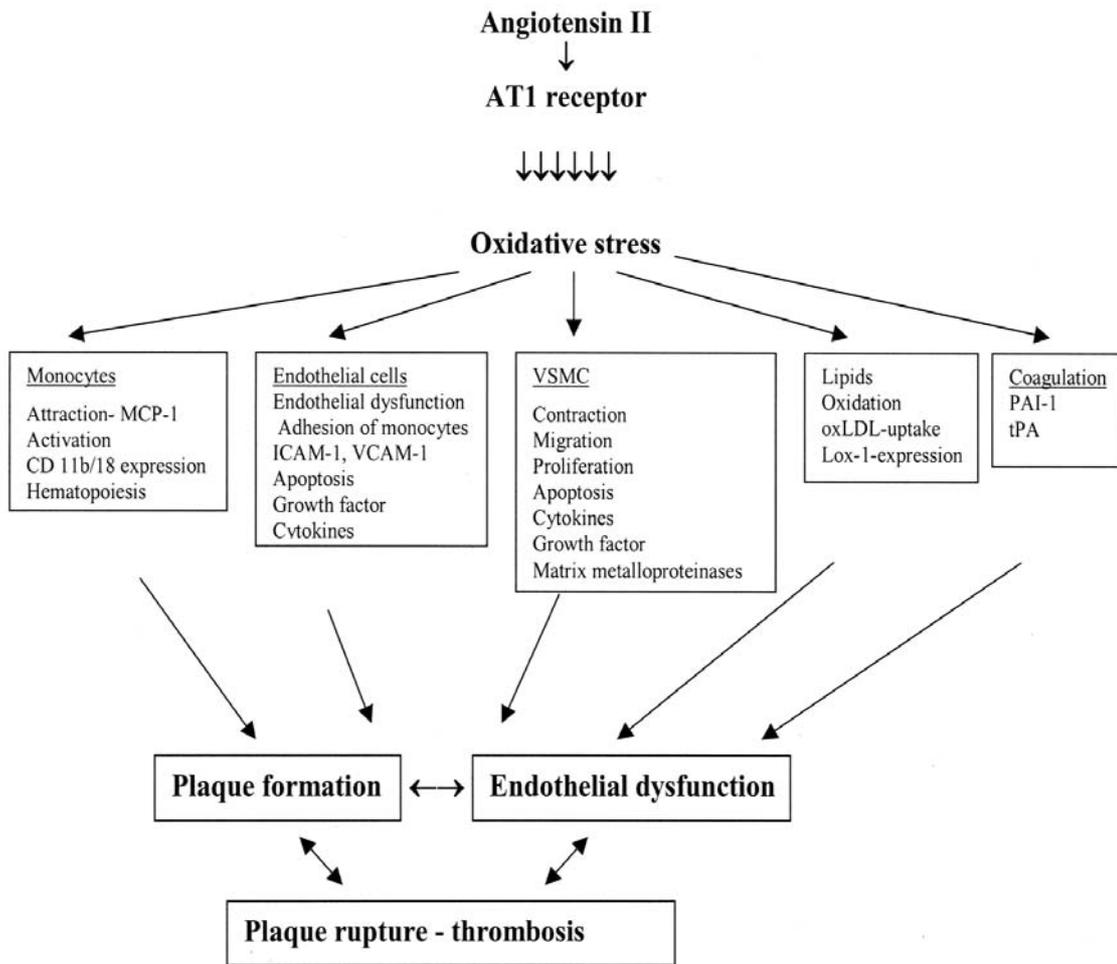


Abbildung 2.6: AT II induziert über den AT₁ Rezeptor oxidativen Stress und Arteriosklerose: Der oxidative Stress steuert über komplexe integrierte Mechanismen zur endothelialen Dysfunktion, Plaqueformation und schließlich dessen Ruptur bei [114].

2.5.4. Angiotensin und ROS Produktion

Der Effekt von AT II auf die Produktion und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen ist in den letzten Jahren immer mehr in den Mittelpunkt geraten. Um diesen Einfluss des AT II besser verstehen zu können, wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt [85, 86, 121, 122]. AT II erhöhte die Aktivität und Expression der vaskulären NAD(P)H Oxidase. Inkubationen von Endothelzellen und glatten Muskelzellen mit AT II resultierten in einer Steigerung der Aktivität und Expression der NADPH Oxidase Untereinheiten (gp 91^{phox}, p22^{phox}) [88]. In vivo Behandlungen mit AT II steigerten die Expression von p22^{phox}, gp91^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} in Endothelzellen und glatten Muskelzellen [123]. Weitere Erkenntnisse über die Rolle von NAD(P)H Oxidase bei vaskulären Erkrankungen fand man in knockout Experimenten. Infusionen von AT II in Wildtyp Mäusen steigerten die $\bullet\text{O}_2^-$ Produktion und den Blutdruck, welche in gp91^{phox} knockout Tieren signifikant reduziert waren [124]. Die Gabe von AT II zeigte weiterhin eine signifikante Steigerung der vaskulären $\bullet\text{O}_2^-$ Produktion in der Aorta der Wildtyp Maus verglichen mit p47^{phox} knockout Mäusen [125]. Diese Daten zeigten klar eine entscheidende Rolle der NAD(P)H Oxidase in der AT II vermittelten Steigerung des oxidativen Stress im vaskulären Gewebe.

Die Inkubation von kultivierten Endothelzellen der Rattenaorta mit AT II zeigte eine Stimulation der Freisetzung von NO [126]. Diese Reaktion wird über den AT₁ Rezeptor vermittelt, dieses konnte durch eine spezifische Inhibierung dieses Rezeptors mit Lorsartan bestätigt werden. Die AT II stimulierte Produktion von $\bullet\text{O}_2^-$ erfolgt ebenfalls über den AT₁ Rezeptor [127]. Die simultane Freisetzung von NO und $\bullet\text{O}_2^-$ als Antwort auf die AT II Stimulation wurde demonstriert in vitro [126], wie auch im menschlichen Körper [128]. Reagieren die beiden Produkte miteinander, führt dies zur verringerten Bioverfügbarkeit von NO.

2.6. Angiotensin-Endothelin Interaktion

Vergleicht man die Eigenschaften von AT II und ET-1 miteinander, fällt ein Synergismus in ihren Effekten auf. Für beide Substanzen sind vasokonstriktorische sowie mitogene Eigenschaften beschrieben worden (s. Abb. 2.7). Zahlreiche Studien belegen intensive Wechselwirkungen zwischen den beiden Systemen [54, 129, 130]. So kann ET-1 die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II fördern und die durch Angiotensin II vermittelte Aldosteronsekretion steigern [129]. AT II ist wiederum ein starker Stimulus der ET-1 Synthese. Die von AT II induzierte zelluläre Hypertrophie der Kardiomyozyten wird offenbar durch eine AT II bedingte transkriptionelle Steigerung der ET 1-Synthese vermittelt [130]. Möglicherweise ist damit auch ein Teil der Effekte der ACE-Inhibitoren auf den Blutdruck und die Regression der linksventrikulären Hypertrophie über eine Reduktion der ET 1-Synthese zu erklären [131].

Für Angiotensin II wurde in vielen Experimenten gezeigt, dass es die Produktion von Endothelin-1 stimuliert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass viele der physiologischen und pathologischen Effekte von AT II tatsächlich über Endothelin und durch dessen Interaktionen an spezifischen Rezeptoren vermittelt wird. Nur wenig ist bisher bekannt über die funktionelle Interaktion zwischen ET und AT II. Die bisherigen Ergebnisse lassen starke und komplexe Assoziationen zwischen diesen zwei Faktoren in der Kontrolle von vaskulären Funktionen vermuten. In dieser Arbeit sollen nach Stimulation von Arteria mammaria interna Sementen die Wechselwirkungen zwischen AT II – oxidativer Stress – Antioxidantien - ET-1 genau charakterisiert werden.

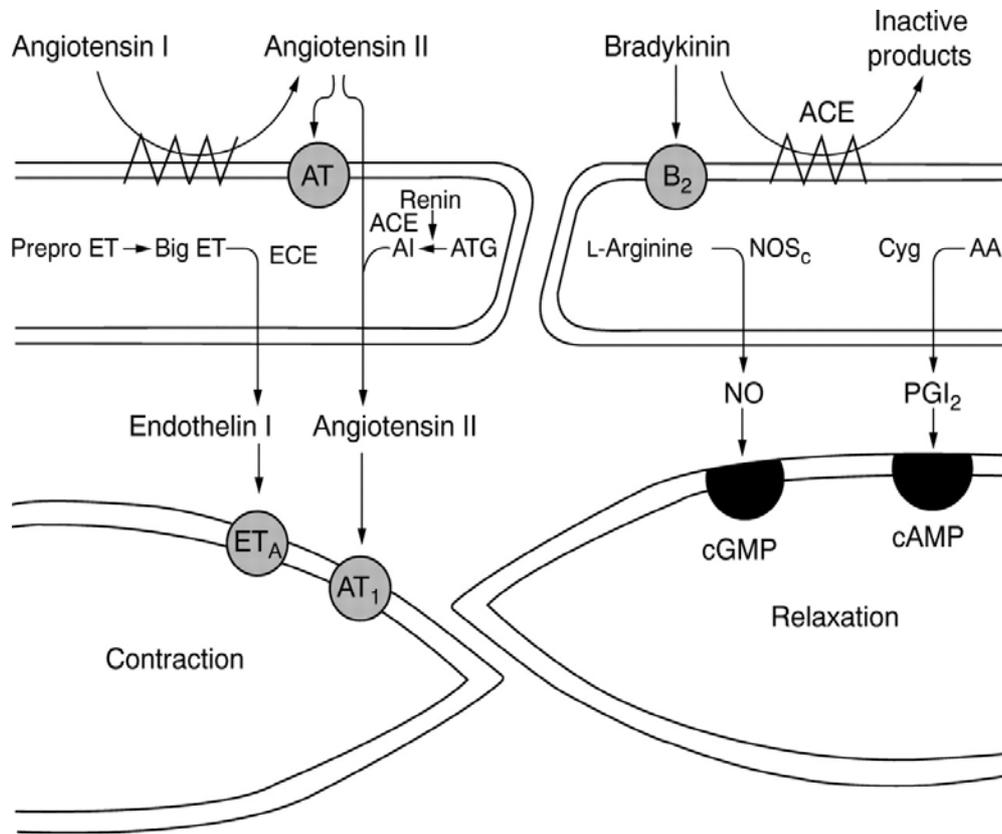


Abbildung 2.7: Das Endothel spielt eine bedeutende Rolle in der Kontrolle des Gefäßsystems: Die Bindung vom Angiotensin II am AT₁ Rezeptor führt zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen. Dieser Effekt wird durch das Endothelin-1 unterstützt. ACE-Inhibitoren blockieren den Abbau des Bradykinin und steigern damit die Aktivität des NO Signalweges. Dieses führt zur verstärkten Vasodilatation [32].

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. Studien an Arteria mammaria interna Segmenten

3.1.1. Patientencharakteristika

Für die Experimente wurden Arteriensegmente von Patienten, bei denen eine Indikation zur operativen Myokardrevaskularisation gestellt wurde, verwendet. Die Patienten waren im Alter von 62 bis 93 Jahren und hatten verschiedene kardiale Risikofaktoren. Das Patientenkollektiv bestand sowohl aus Frauen als auch aus Männern. Der Antrag für die Genehmigung dieser Studie wurde bei der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg eingereicht. Die Genehmigung durch die Ethik-Kommission wurde am 25.02.2000 erteilt (Aktenzeichen OB / II / 2000).

3.1.2. Entnahme und Präparation der Gefäße

Benötigte Materialien

- Petrischale (Nunclon Surface)
- Mikroschere (N. Mueller 120 mm FM 010R, Fa. AESCULAP®)
- Mikropinzette (N. Mueller 110 mm FM 001R, Fa. AESCULAP®)
- Feinnadelkanüle (0.45 x 12 mm, Fa. Braun-Melsungen)
- Einwegspritze (1 ml, Fa. Becton Dickinson, UK)
- Einmalskapells (Fa. Braun-Melsungen)
- Mikroskop (Fa. Hund Wetzlar)
- Krebs/Hepes Puffer (s. Abschnitt 3.5.)
- Eis

Die Studien erfolgten an humanen Arteria mammaria interna (IMA) Segmenten, die freundlicherweise von der Herzchirurgischen Abteilung des Universitären Herzzentrum Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. Reichenspurner zur Verfügung gestellt wurden. Die chirurgische Präparation der A. mammaria interna im OP erfolgte unter möglichst atraumatischen Bedingungen. Die nicht für die Bypassse benötigten distalen Segmente der LIMA (linke IMA) und RIMA (rechte IMA) wurden sofort in ein mit 40 ml Krebs/Hepes Puffer gefülltes Probengefäß gegeben und eisgekühlt.

Die weitere Präparation der Gefäße erfolgte ohne Verzögerung im Labor. Die Gefäße wurden dabei stets in einer mit eisgekühltem Krebs/Hepes Puffer gefüllten Petrischale präpariert. Die Arterien wurden mittels einer Mikroschere und einer Mikropinzette vom paravasalem Fett und Bindegewebe sowie Adventitia befreit (s. Abb. 3.1) Um die sehr dünne und empfindliche Endothelschicht nicht zu verletzen, wurde sehr genau darauf geachtet, das Gefäß weder zu dehnen, noch zu quetschen oder die Innenwände zu verletzen.

Mit einer Einwegspritze und Feinnadelkanüle wurde das Lumen vorsichtig mit Krebs/Hepes Puffer perfundiert, um eventuell vorhandene Blutreste zu entfernen. Beide Enden wurden mit Hilfe eines sterilen Einmalskapells um je 0,2 cm gekürzt, da dort erfahrungsgemäß OP-Klemmen saßen, welche das Endothel schädigen. Daraufhin wurde das Gefäß in gleich große Stücke geteilt. Diese wurden dann weiter mit dem Einmalskapell zerkleinert, um eine möglichst große Oberfläche zu erzielen.



Abbildung 3.1: Darstellung der Präparation der Arteria mammaria interna Segmente: Unter dem Mikroskop wurde das Gefäß vom paravasalem Binde- und Fettgewebe getrennt.

3.1.3 Inkubation

Benötigte Materialien und Geräte

- Falcon Tubes 50 ml (Fa. Becton/Dickson)
- Falcon Tubes 15 ml (Fa. Becton/Dickson)
- Carbogen (Fa. Air Products)
- Krebs/Hepes Puffer (s. Abschnitt 3.5.)
- Xanthin-Oxidase
- Xanthin
- SOD
- Katalase
- HCL 1n
- NaOH
- Aqua dest.

Herstellen der Inkubationsmedien

Für die Inkubation wurde Krebs/Hepes Puffer verwendet. Dieser wurde für jeden Versuch frisch nach standardisiertem Schema angerührt (s. Abschnitt 3.5.) und mit Hilfe eines pH-Meters auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt. Bis zur Verwendung wurde der Puffer auf Eis gelagert. Die Reagenzien wie Xanthinoxidase, Angiotensin II sowie die Antioxidantien wurden auf Raumtemperatur gebracht.

Herstellen einer 0,1 molaren Xanthin-Lösung

- 300 mg Xanthin auf Präzisionswaage abwiegen
- 15 ml aqua dest. und 2 ml NaOH 1n in ein Falcon geben
- auf 60°C erwärmen
- Xanthinpulver löst sich nach 15-20 min
- auf 20 ml mit aqua dest. auffüllen, aliquotieren und bei -20°C einfrieren
- für Inkubationsmedien Xanthin bei 70°C lösen

Inkubationsmedium mit Xanthinoxidase

- 30 ml Krebs/Hepes-Puffer in 50 ml Falcon für Kontrolle
- 20 ml Krebs/Hepes-Puffer in 50 ml Falcon für Inkubation mit Reagenzien
- 300 µl Xanthin (1 mmol/l) in alle Falcons außer Kontrolle
- 30 µl HCL (1n) in alle Falcons außer Kontrolle
- Xanthinoxidase 5 U/l, 15 U/l und 30 U/l in die entsprechenden Falcons auf 30 ml mit Krebs/Hepes-Puffer auffüllen

Inkubationsmedium mit Xanthinoxidase + SOD + Katalase

- Ansatz wie oben beschrieben
- zusätzlich Falcon mit 5, 15, 30 U/l SOD 300 U/ml + Katalase 375 U/ml
- wie oben + SOD 600 U/ml + Katalase 750 U/ml

Inkubationsmedium mit Angiotensin II

- 30 ml Krebs/Hepes-Puffer in 50 ml Falcon für Kontrolle
- 20 ml Krebs/Hepes-Puffer in 50 ml Falcon für Inkubation
- 10^{-5} mol/l Angiotensin II in Falcon außer Kontrolle
- auf 30 ml mit Krebs/Hepes-Puffer auffüllen

Inkubationsmedium mit Angiotensin II + SOD + Katalase

- Ansatz wie oben beschrieben
- zusätzlich zu Falcon mit 10^{-5} mol/l Angiotensin II SOD 300 U/ml + Katalase 375 U/ml
- weiterer Ansatz mit SOD 600 U/ml + Katalase 750 U/ml

Durchführung der Inkubation

Die Inkubationsmedien wurden wie oben beschrieben vorbereitet und das Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Gefäße wurden in den unterschiedlichen Medien für jeweils 4 Stunden unter ständiger Sauerstoffinsufflation inkubiert. Um die kontinuierliche O₂-Insufflation während des Experiments zu gewährleisten, wurde Carbogen, ein Gemisch aus 95 % O₂ und 5 % CO₂, in einer 10 l Druckgasflasche benutzt. Über Plastikleitungen, die am Ende mit einer 200 µl Pipette bestückt waren, wurde das Sauerstoffgemisch in die Inkubationsröhrchen geleitet (s. Abb. 3.2). Das Wasserbad wurde auf einen leichten Schüttelmodus eingestellt.



Abbildung 3.2: Darstellung des Versuchsaufbaues: Über die Plastikleitungen erfolgte die kontinuierliche Sauerstoff (O_2) Insufflation in die Inkubationsmedien.

Vorbereitung der Proben zur Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der intrazellulären Big Endothelin-1-Protein Konzentration wurden die Gefäße nach Ablauf der Inkubation in 250 μ l PBS homogenisiert. Vor der Homogenisation wurden die Segmente einzeln mit einer Präzisionswaage gewogen, um später Aussagen über die die massenbezogene Big Endothelin-1 Konzentration machen zu können. Das Homogenisat wurde bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

Die Konzentration von synthetischen Big Endothelin-1 nach Inkubation mit reaktiven Sauerstoffspezies wurde mittels ELISA (s. Abschnitt 3.3.1.) quantifiziert. Während ET-1 nur eine Halbwertszeit von weniger als einer Minute besitzt, beträgt diese bei Big ET-1 etwa eine Stunde. Aufgrund dieser längeren Nachweisbarkeit des Big ET-1 im Vergleich zum ET-1 und aufgrund der Tatsache, dass die Konzentration vom Big ET-1 2-3 fach höher als die Endothelin-1 ist, wurde der Big ET-1 ELISA verwendet. Der verwendete ELISA hatte einen Messbereich von 0,025–6,25 fmol/mg und eine Spezifität von 99%.

3.2. Studien mit Blutproben von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie

3.2.1. Studienprotokoll

Auswahl der Patienten

In die Studie wurden 13 Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit mittel- bis hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Funktion eingeschlossen. Bei den Patienten bestand bereits die Indikation zu einer Koronarangiographie oder –intervention. Der Antrag für die Genehmigung dieser Studie wurde am 02.10.2003 bei der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg, Heinrich-Hertz-Strasse 125, 22083 Hamburg, eingereicht. Die Genehmigung durch die Ethik-Kommission wurde am 17.11.2003 erteilt (Bearb.-Nr.:2024). Weiterhin bestand eine Genehmigung des Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3, 53175 Bonn mit dem Datum vom 13.11.2003 (Vorlagennummer: 4019731) sowie ein Einverständnis zur Anwendung von Röntgenstrahlen am Menschen in der medizinischen Forschung, mit dem Antrag vom 03.09.2002 beim Bundesamt für Strahlenschutz, 85764 Oberschleißheim (Z5-22462/2-2002-013). Es wurden nur diejenigen Patienten zur Teilnahme an der Studie angesprochen, die bereits ihre Zustimmung zu dem klinisch angezeigten Eingriff oder der klinisch angezeigten Koronarangiographie gegeben hatten.

Einschlusskriterien

- Angiographisch dokumentierte koronare Herzkrankheit mit
 - a) generalisierten Wandveränderungen (Stenosen <40 %) und/oder
 - b) dem Vorliegen einer signifikanten Läsion mit Indikation zur perkutanen Koronarintervention
 - c) echokardiographisch oder angiographisch mittel bis hochgradig eingeschränkte LV-Funktion, EF von 35 % oder kleiner
- 18 Jahre oder älter
- schriftliches Einverständnis

Ausschlusskriterien

In Bezug auf die medizinische Vorgeschichte:

- Myokardinfarkt vor 2 Wochen
- instabile Angina pectoris
- Schlaganfall in den letzten 12 Wochen
- bekannte Intoleranz gegenüber Oxypurinol bzw. Allopurinol

In Bezug auf aktuell eingenommene Medikamente:

- Einnahme von Allopurinol-Präparaten in den letzten 2 Wochen vor Studieneinschluss
- Heparinisierung innerhalb der letzten 24 h vor Einschluss

3.2.2. Dosierung und Therapiedauer

Die Patienten erhielten einmalig Oxypurinol 6,7 mg/min, infundiert über eine periphere Vene mit 1 ml/min über 30 Minuten. Die Dosis betrug einmalig 200 mg.

Prüfsubstanz Oxypurinol

Oxypurinol ist das Abbauprodukt von Allopurinol, welches seit vielen Jahren zur Behandlung der Hyperurikämie zugelassen ist. Es ist der hauptverantwortliche Metabolit der Allopurinolwirkung. Bisherige Untersuchungen mit Allopurinol und Oxypurinol zeigten eine Verbesserung der Endothelfunktion bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit [132, 133], Diabetes [132] und Hypercholesterinämie [80]. Oxypurinol zeigte im Vergleich zum Allopurinol ein geringeres Profil an Nebenwirkungen. Das Prüfmedikament wurde über den MDS Pharma Service in Tampa, Florida bezogen. Die Zubereitung der Substanz zur i.v.-Gabe erfolgte durch die Apotheke des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf.

3.2.3. Durchführung

Bei Vorliegen einer interventionsbedürftigen Stenose wurde diese mittels einer Angioplastie behandelt. Die Infusion von Oxypurinol und die Entnahme des Blutes aus der Aorta erfolgte innerhalb der gleichen Katheteruntersuchung. Über eine arterielle Schleuse wurde ein Katheter bis in die Aorta vorgeschoben und vor sowie nach Beendigung (Dauer 30 Minuten) der Oxypurinolinfusion Serumproben entnommen. Die Blutproben wurden zentrifugiert und das Serum bei -80°C gelagert. Obwohl pathophysiologisch die Endothelin-1 Konzentration bedeutsam ist (140 fache Steigerung der Potenz der Vasokonstriktion verglichen mit dem Big ET) wurde wie bei der vorherigen Studie die Proteinkonzentration mit Hilfe eines ELISA, der die Big Endothelin Konzentration misst, bestimmt (s. Abschnitt 3.1.3.). Aufgrund der zu erwartenden höheren Konzentrationen wurde jedoch ein anderes Messprotokoll (Protokoll Aa vom Biomedica ELISA) verwendet. Dieses war für einen Messbereich von 0,05–15,5 fmol/ml geeignet.

3.3. Quantitative Bestimmung der Big Endothelin-1 Proteinkonzentration

Die folgende Beschreibung des Versuchsablaufes galt sowohl für die Studie mit humanen Arteria mammaria interna Segmente, als auch für die Studie mit den Serien der Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie.

Benötigte Materialien und Geräte

- Big Endothelin ELISA Kit (Cat. No. BI-20072, Biomedica Gruppe Wien)
- Multichannel Pipette für 50 – 300 µl (Finnpipette[®] H50168, Labsystems)
- Pipettenspitzen (741065, Fa. Greiner)
- Mikrotiterplattenphotometer (SLT Spectra, Fa. Labinstruments): Meßwellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 620 nm
- Software für Messung (Easy-Fit, Version 7.17)
- Schüttelinkubator für 37 C (Th 15, Edmund Bühler)
- Vortexer (VF2 Fa. Janke & Kunkel IKA[®] - Labortechnik)
- Schale für Waschpuffer (4870, Fa. Corning Incorporated)
- Multistep Pipette (Multipette[®] plus, Fa. Eppendorf)
- Pipettenspitze (Fa. Eppendorf)
- Lichtundurchlässige Abdeckung für Dunkelreaktion
- Zentrifuge (Rotina 35R, Fa. Hettich Zentrifugen)
- Coulter Mixer (Fa. Coulter Electronics Limited)
- PBS (s. Abschnitt 3.5.)

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

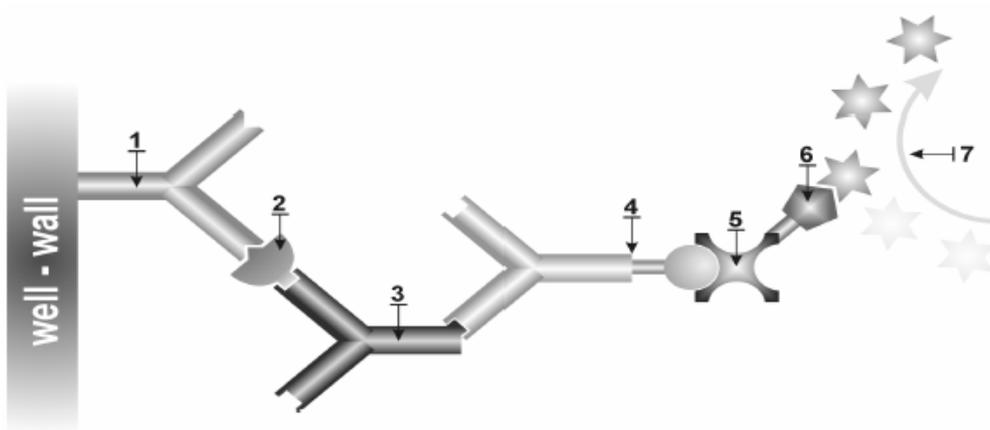


Abbildung: 3.3: ELISA Prinzip [134]

- 1 Vorbeschichteter polyklonaler anti Big Endothelin Antikörper
- 2 Probe/Kontrolle
- 3 Detektionsantikörper, monoklonaler anti Big Endothelin Antikörper
- 4 Konjugat
- 5 Substrat
- 6 Stopplösung
- 7 Enzymkatalysierter Farbumschlag

Das Prinzip des Big Endothelin-1 ELISA beruht auf einer Sandwich Technik. Der für Big Endothelin-1 (1-38) spezifische Sandwich ELISA verwendet einen auf Mikrotiterplatten beschichteten immunoaffinitäts-chromatographisch gereinigten polyklonalen Erstantikörper. Dieser polyklonale Antikörper bindet an dem C – (22-38) terminalen Ende der Big ET-1 Region. Ein monoklonaler Zweitantikörper bildet mit dem in der Probe vorhandenen Big Endothelin-1 und dem gebundenen Erstantikörper ein Sandwich. Nach einem Waschschrift, der alle nicht spezifisch gebundenen Substanzen entfernt, wird die Menge an gebundenem monoklonalen Antikörper bestimmt. Sie entspricht der Menge an in der Probe vorhandenem Big Endothelin-1. Zur Detektion wird ein mit Peroxidase konjugierter anti-Maus Antikörper eingesetzt. Nach einem erneuten Waschschrift wird Tetramethylbenzidin (TMB) als Substrat zugegeben. Die Konzentration an Big Endothelin-1 in der Probe ist direkt proportional zu der im ELISA-Photometer messbaren Farbentwicklung.

3.3.2. Versuchsdurchführung

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die Proben wurden für 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Standards und Kontrolle wurden jeweils in 1 ml PBS und der monoklonalen Antikörper in 5,5 ml PBS gelöst. Diese wurden bei Raumtemperatur für etwa 30 min auf dem Rollmischer gut gemischt. Der mitgelieferte Waschpuffer wurde 1:10 verdünnt. Es wurden jeweils 100 µl (Studie mit Serum) bzw. 200 µl (Studie mit Gefäßen) Standard/Probe/Kontrolle in die Mikrotiterstreifen pipettiert. Hinzu kamen 50 µl Antikörper mit Ausnahme des Leerwertes. Die Streifen wurden abgedeckt und für 3 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Inhalte der Wells wurden verworfen und fünfmal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Reste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Weiterhin wurden 100 µl bzw. 200 µl Konjugat in alle Wells pipettiert. Erneut wurde der Streifen abgedeckt und für 1 Stunde bei 37°C in einen Schüttelinkubator gegeben. Es schlossen sich erneut fünf Waschschriffe an (s. o.). Es folgte das Hinzufügen von 100 µl bzw. 200 µl Substrat in alle Wells sowie die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln. Danach wurde jeweils 50µl Stopplösung in alle Wells pipettiert und alles gut durchmischt.

3.3.3. Messung der Extinktion und Erstellung der Kalibrationsgeraden

Die Extinktion wurde mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Als Referenzwellenlänge wurde 620 nm gewählt. Zur Kalibration des Photometers wurden vor jeder Meßreihe Messungen mit bekannten Konzentrationen gemacht. Aus diesen Daten wurde mittels MATLAB eine Kalibrationsgerade nach der Methode der Minimierung der Fehlerquadrate ermittelt.

3.4. Statistische Auswertung

Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe der zuvor erstellten Kalibrationsgeraden und wurde ebenfalls in MATLAB implementiert. Alle in dieser Arbeit dargestellten Daten sind arithmetische Mittelwerte \pm SEM. Vergleiche zwischen Datengruppen wurden mit dem Student'schen T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde für Werte $p < 0,05$ angenommen. Die Anzahl der Versuchselemente ist jeweils den Bildunterschriften mit n angegeben.

3.5. Verwendete Materialien

3.5.1. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Angiotensin II	(Fa. Sigma-Aldrich)
NaCl	(Fa. Mallinckrodt Baker B.V)
KCl	(Fa. Merck)
CaCl ₂	(Fa. Merck)
MgSO ₄	(Fa. Merck)
NaHCO ₃	(Fa. Merck)
K ₂ HPO ₄	(Fa. Merck)
HEPES	(Fa. Sigma-Aldrich)
D(+)-Glucose	(Fa. Merck)
Na ₂ HPO ₄	(Fa. Merck)
Oxypurinol	(MDS Pharma Service, Florida, USA)
Katalase	(Fa. Sigma-Aldrich)
Superoxiddismutase	(Fa. Sigma-Aldrich)
Xanthin	(Fa. Sigma-Aldrich)
Xanthinoxidase	(Fa. Sigma-Aldrich)
HCL	(Fa. Roth)

3.5.2. Zusammensetzung verwendeter Lösungen

1. Krebs/Hepes-Puffer

<u>Reagenz</u>	<u>Molare Masse</u>	<u>Masse</u>
• NaCl	58,44 g/ mol	5,782 g
• KCl	74,56 g/ mol	0,35 g
• CaCl ₂	147,02 g/ mol	0,366 g
• MgSO ₄	246,48 g/ mol	0,296 g
• NaHCO ₃	84,01 g/ mol	2,1 g
• K ₂ HPO ₄	228,23 g/ mol	0,14 g
• HEPES	238,80 g/ mol	5,206 g
• D(+) Glucose	180,16 g/ mol	2,0 g
• in 1000 ml aqua dest. gelöst		
• pH 7,35		

2. PBS

<u>Reagenz</u>	<u>Molare Masse</u>	<u>Masse</u>
• NaCl	58,44 g/ mol	8,0 g
• KCl	74,56 g/ mol	0,2 g
• KH ₂ PO ₄	136,09 g/ mol	0,2 g
• Na ₂ HPO ₄	177,99 g/ mol	0,763 g
• auf 1000 ml mit aqua dest. auffüllen		
• pH 7,6		

4. ERGEBNISSE

4.1. Studien an humanen Arteria mammaria interna Segmenten

Im Zellkulturmodell (HUVEC Zellen) konnte bereits eine Steigerung der Big Endothelin-1 Synthese nach Stimulation mit oxidativem Stress gezeigt werden. In Versuchen mit humanen A. mammaria interna Segmenten ex vivo konnte immunohistochemisch ein Anstieg des Big ET qualitativ aufgezeigt werden. Um diesen Anstieg quantifizieren zu können, wurden in dieser Studie Versuche mit humanen Arteria mammaria interna Segmenten durchgeführt und das Big Endothelin-1 mittels ELISA bestimmt.

Um die Auswirkung von oxidativem Stress auf die Endothelinsynthese in humanen Arteria mammaria Segmenten zu untersuchen, wurden diese mit reaktiven Sauerstoffderivaten inkubiert. Oxidativer Stress wurde in diesen Experimenten durch das System Xanthin/Xanthinoxidase und durch Angiotensin II generiert. Alle Ergebnisse waren in wiederholten Versuchsdurchführungen reproduzierbar.

4.1.1. Effekt von Xanthin/Xanthinoxidase auf die intrazelluläre Big Endothelin-1 Protein Konzentration

Um den durch X/XO vermittelten stimulierenden Effekt auf die Endothelin-1 Synthese zu untersuchen, wurde immunoreaktives Big Endothelin-1 intrazellulär quantifiziert. Hierzu wurden A. mammaria interna Segmente über den Zeitraum von 4 Stunden mit 1 mmol/l Xanthin und 5 U/l Xanthinoxidase sowie mit 15 U/l und 30 U/l Xanthinoxidase inkubiert. Im Anschluß an die Exposition wurden die Gefäße homogenisiert, um das intrazelluläre Big ET-1 zu bestimmen. Die Big ET-1 Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt.

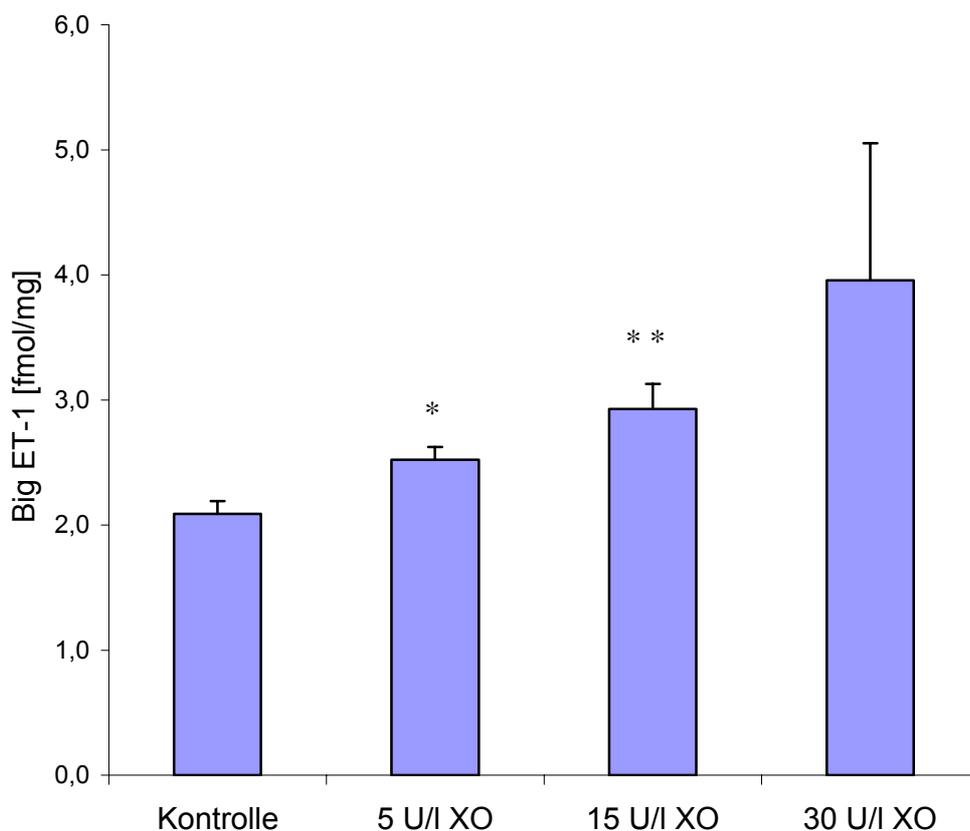


Abbildung 4.1: Konzentration des intrazellulären Big Endothelin-1 bei Inkubation mit X/XO in den ausgewiesenen Konzentrationen: XO führte zu einem Anstieg der Big Endothelin Spiegel. Expositionszeit 4 Stunden; n=17; * p<0,05 5 U/l vs. Kontrolle; ** p<0,05 15 U/l vs. Kontrolle.

Der stimulierende Effekt von X/XO auf humane Arteria mammaria interna Segmente konnte durch die Bestimmung der intrazellulären Big Endothelin-1 Konzentration bestätigt werden. Der Anstieg des Big Endothelin-1 war konzentrationsabhängig. Unter der Stimulation von 5 U/l XO kam es zu einem signifikanten Anstieg von 20 %, unter 15 U/l ein signifikanter Steigerung von 40 % und unter 30 U/l zu einem Anstieg von 75 % gegenüber der Inkubation in Abwesenheit von X/XO. Jedoch zeigten sich unter der Konzentration von 30 U/l widersprüchliche Ergebnisse. Dieses Ergebnis war nicht signifikant. Nur der Mittelwert aller Versuche ließ einen Anstieg erkennen. Dieses Ergebnis war gegenüber der Kontrolle nicht signifikant. Bei den Ergebnissen der Einzelinkubationen zeigten sich Werte den Kontrollen entsprechend. Somit ist davon auszugehen, dass eine Stimulation in der hohen Konzentration von 30 U/l in einzelnen Fällen zu keinem Anstieg der Big ET-1 Synthese führte.

4.1.2. Wirkung von Radikalscavengern auf die Big ET-1 Konzentration

Um festzustellen, ob der beobachtete Effekt unter Xanthinoxidase bedingt war durch die Produktion von freien Sauerstoffradikalen, wurde in weiteren Experimenten eine Koinkubation der Gefäße mit Superoxiddismutase (SOD) und Katalase (CAT) durchgeführt. SOD und CAT inaktivieren enzymatisch die durch das System X/XO generierten reaktiven Sauerstoffradikale. Hierzu wurde als Konzentration der XO 15 U/l verwendet, da unter dieser Inkubation die höchste Stimulation der Endothelin Synthese gezeigt werden konnte (s. Abb. 4.1). Als Konzentrationen für SOD und CAT wurden 600 U/l bzw. 750 U/l verwendet, da unsere Arbeitsgruppe unter dieser Konzentration mit Endothelzellen den größten Suppressionseffekt zeigen konnte [135].

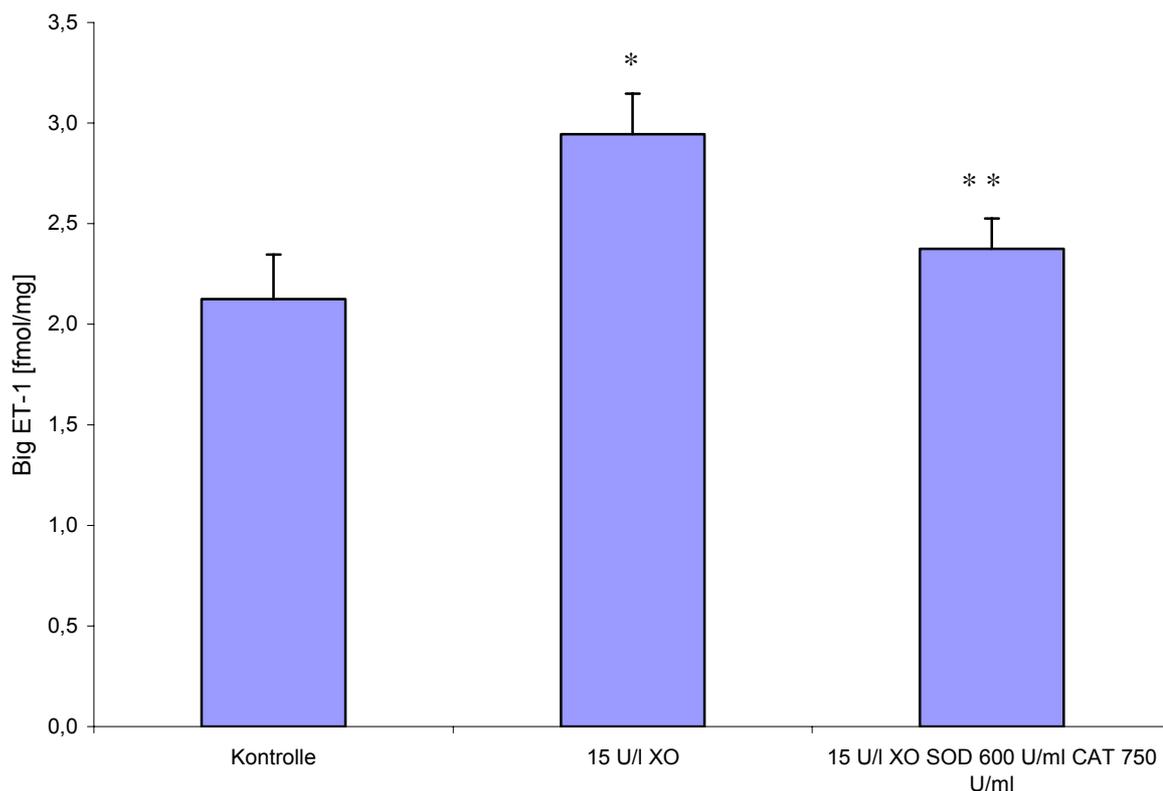


Abbildung 4.2: Konzentration des intrazellulären Big ET-1 in fmol/mg bei Inkubation mit 15 U/l XO und 1mmol/l Xanthin: XO führt zu einem Anstieg der Big ET Spiegel. Unter Koinkubation mit SOD und CAT wurde dieser Effekt inhibiert. Expositionszeit 4 Stunden; n=12; * p<0,05 vs. Kontrolle; ** p<0,05 vs. 15 U/l XO.

Die Big Endothelin-1 Konzentration zeigte unter der Stimulation von 15 U/l XO einen signifikanten Anstieg gegenüber dem Basalwert. Unter der Koinkubation mit SOD und CAT in der ausgewiesenen Konzentration konnte diese Wirkung signifikant gegenüber alleiniger Inkubation mit 15 U/l XO inhibiert werden. Mit einer Konzentration von 600 U/ml SOD und 750 U/ml CAT kam es zu einer fast kompletten Inaktivierung des Effektes der Xanthinoxidase. Die Big ET-1 Konzentration erreichte mit $2,4 \pm 0,38$ fmol/mg wieder das Niveau der Kontrolle, welches bei $2,1 \pm 0,22$ fmol/mg bestimmt wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der in Abb. 4.1 dargestellte beobachtete Effekt auf die spezifisch durch X/XO induzierten Superoxidanionen zurückzuführen war.

4.1.3. Wirkung von Angiotensin II auf die Big Endothelin Synthese

Effekt von unterschiedlichen Konzentrationen von AT II

Wir untersuchten weiterhin den Effekt von Angiotensin II auf die Endothelin Synthese. Dazu wurden humane Arteria mammaria interna Segmente mit unterschiedlichen Konzentrationen an AT II inkubiert. Die Arbeitsgruppe von Berry zeigte nach 4 Stunden einen Anstieg der Superoxidanionen Konzentration in Arteria mammaria interna Gefäßen unter der Inkubation mit AT II. In humanen Saphenavenen kam es nach gleicher Stimulation zu keinem Anstieg [136]. Aufgrund dieser Datenlage wurden für die Versuche humane Arterien und eine Inkubationsdauer von 4 Stunden gewählt. Unsere Arbeitsgruppe demonstrierte mit HUVEC Zellen eine Steigerung der intrazellulären Big ET-1 Konzentration nach AT II Stimulation [99].

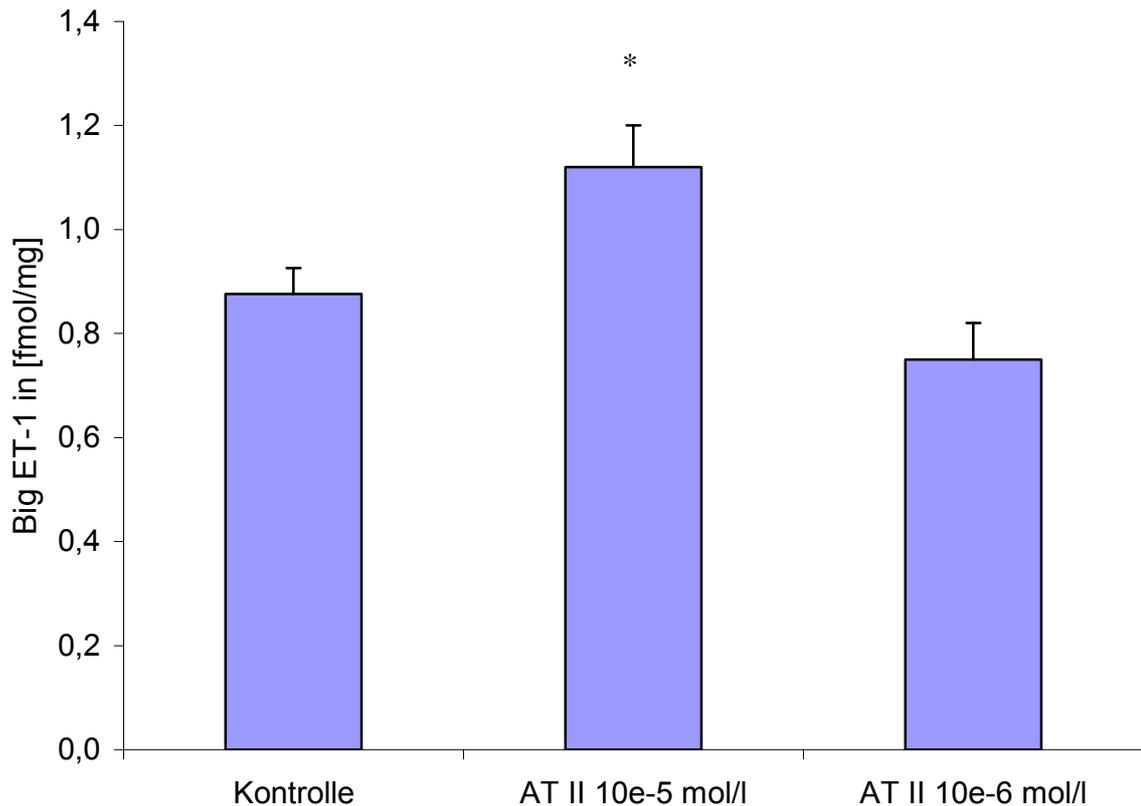


Abbildung 4.3: Effekt von Angiotensin II auf die Big ET-1 Konzentration in humanen Arteria mammaria interna Segmenten: Die Gefäße wurden inkubiert in der Anwesenheit und Abwesenheit von 10^{-5} mol/l bzw. 10^{-6} mol/l AT II. Expositionszeit 4 Stunden; n=8; *p < 0,05 vs. Kontrolle.

Unter der Inkubation mit Angiotensin II war eine Stimulation der Big Endothelin-1 Synthese zu beobachten. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. AT II mit einer Konzentration von 10^{-5} mol/l steigerte die Big Endothelin-1 Konzentration um 19 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Stimulation mit einer geringeren Konzentration von 10^{-6} mol/l AT II zeigte keinen Effekt auf die Synthese von Big Endothelin-1.

4.1.4. Effekt von Radikalscavengern auf die AT II stimulierte Big Endothelin-1 Synthese

Weitere Untersuchungen wurden mit Radikalscavengern durchgeführt, um die Wechselwirkungen von AT II und ROS besser verstehen zu können. Dazu wurden Experimente unter der Stimulation mit 10^{-5} mmol/l AT II durchgeführt, da diese Konzentration einen signifikanten Anstieg der Big Endothelin-1 Konzentration zeigte. Um zu zeigen, ob die beobachtete Stimulation der Big Endothelin-1 Synthese auf eine Angiotensin II induzierte Produktion von freien Sauerstoffradikalen zurückzuführen war, wurde eine Koinkubation mit Superoxiddismutase (SOD) und Katalase (CAT) durchgeführt. SOD und CAT wurden in steigenden Konzentrationen hinzugefügt.

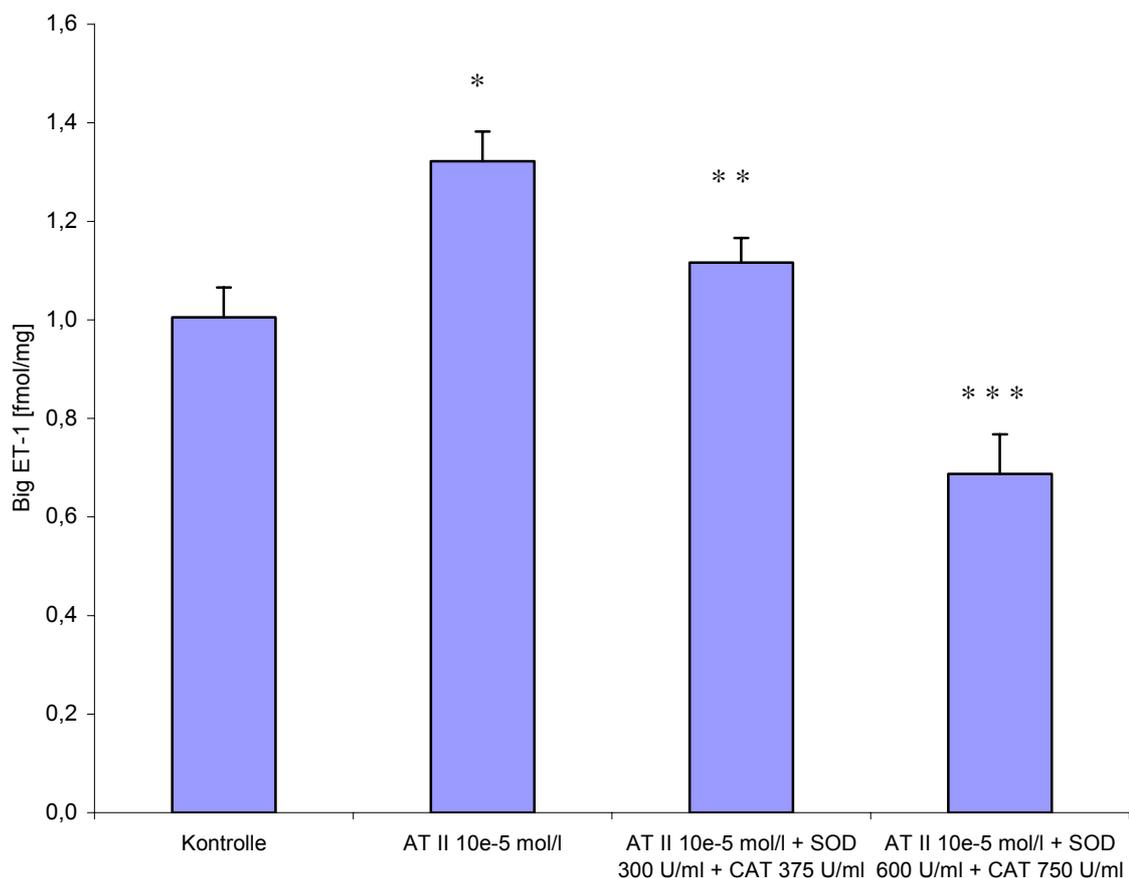


Abbildung 4.4: Konzentration des intrazellulären Big ET-1 bei Inkubation mit Angiotensin II und SOD/CAT in den ausgewiesenen Konzentrationen: Angiotensin II führte zu einem Anstieg der Big ET Konzentration. Unter Koinkubation mit SOD und CAT wurde dieser Effekt konzentrationsabhängig inhibiert. Expositionszeit 4 Stunden; n=8; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0,05$ 300 U/ml vs. 10^{-5} mol/l AT II; *** $p < 0,05$ 600 U/ml vs. 10^{-5} mol/l AT II.

Der stimulierende Effekt von Angiotensin II auf die Endothelin-1 Synthese konnte mittels Bestimmung des Big ET-1 im ELISA bestätigt werden. Unter 10^{-5} mol/l war ein signifikanter Konzentrationsanstieg in Bezug auf den Basalwert zu beobachten. Diese Wirkung konnte durch die Koinkubation mit den Enzymen SOD und CAT in den angegebenen Konzentrationen signifikant gegenüber alleiniger Inkubation mit 10^{-5} mol/l AT II inhibiert werden. Dabei wurden die durch das AT II generierten reaktiven Sauerstoffradikale enzymatisch inaktiviert. Unter 300 U/ml SOD und 375 U/l CAT kam es zu einer signifikanten Reduktion der Big ET-1 Konzentration von 16 % gegenüber der Stimulation mit AT II. Bei einer Konzentration von 600 U/ml SOD und 750 U/ml CAT zeigte sich eine signifikante Reduktion der Big ET-1 Spiegel von 47 %, bezogen auf die alleinige Stimulation mit AT II. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die in Abb. 4.4 dargestellte AT II assoziierte Wirkung auf den Endothelin Metabolismus spezifisch auf die durch AT II generierten Superoxidanionen zurückzuführen war.

4.2. Studie mit Seren von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie Wirkung von Oxypurinol auf die Big Endothelin-1 Synthese

Oxidativer Stress ist ein zentraler Pathomechanismus der Endotheldysfunktion im Koronarbett von Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Die Ursachen von erhöhtem oxidativem Stress bei diesen Patienten sind bisher aber nur ungenügend verstanden. In den letzten Jahren gab es zunehmend Hinweise dafür, dass die Xanthinoxidase, durch die Synthese von Superoxid, von großer Bedeutung sein könnte. Xanthinoxidase findet sich in hoher Konzentration im Endothel und Myokard von Patienten mit koronarer Herzkrankheit und lässt sich durch Purin-Analoga wie Allopurinol bzw. den aktiven Metaboliten Oxypurinol inhibieren. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob sich durch die Gabe von Oxypurinol die Konzentration des Big ET-1 senken lässt. Die Ergebnisse dieser Studie sind von ausgesprochen großer Bedeutung, nicht nur für das Verständnis der zugrunde liegenden Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit, sondern insbesondere auch für einen möglicherweise neuen Therapieansatz für dieses Patientenkollektiv.

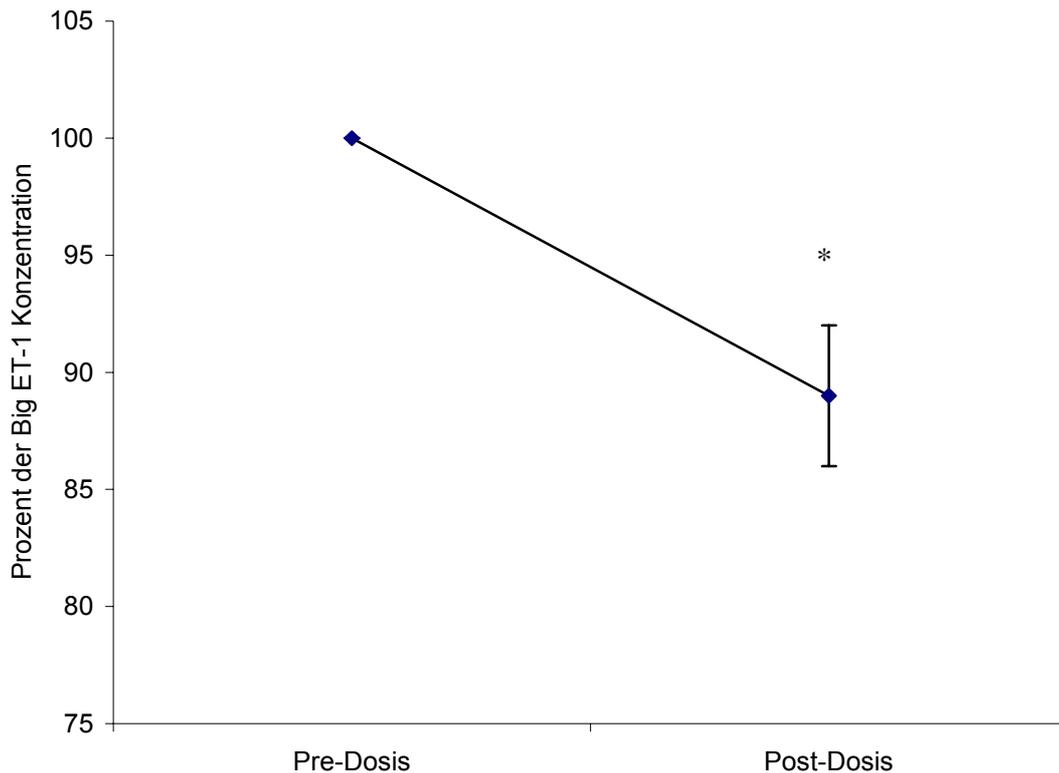


Abbildung 4.5: Darstellung der Konzentrationen von Big ET-1 im Serum vor und nach Gabe von 200 mg Oxypurinol iv über 30 min; n=13; * p<0,05 vs. Pre-dose

Nach Verabreichung von 200 mg Oxypurinol über 30 Minuten intravenös, konnte die Big ET-1 Konzentration signifikant gesenkt werden. Für die Darstellung in der Abbildung 4.5 wurden alle Messwerte auf die Pre-Dosis Werte normiert. Die gemessenen Pre-Dosis Konzentrationen wurden gleich 100 Prozent gesetzt. Eine Darstellung mit den absoluten Konzentrationen des gemessenen Big ET-1 erschien nicht sinnvoll, da bei der Heterogenität des Kollektives eine große Streuung in den Konzentrationen auftrat. Die Range der Pre-Dosis Werte reichte von 3,2 fmol/ml bis 52,3 fmol/ml. Der Post-Dosis Wert zeigt den Mittelwert aus den Prozentsätzen der Konzentration nach Gabe von Oxypurinol. Im Durchschnitt konnte die Big ET-1 Konzentration um 16 % gesunken werden. Bei 9 von 13 Patienten kam es nach Oxypurinol Gabe zu einer Reduktion der Big ET-1 Konzentration. Bei 4 Patienten blieb ein Effekt nach Gabe von 200 mg Oxypurinol aus.

5. DISKUSSION

Reaktive Sauerstoffspezies wirken als pathogene Faktoren bei der Entstehung und Progression der endothelialen Dysfunktion und Hypertonie [27, 137]. Sie sind beteiligt an der kurzfristigen Regulation des Vasotonus und an langfristigen Umbauvorgängen innerhalb der Gefäßwände. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass oxidativer Stress zu einer Steigerung der endogenen Endothelin-1 Synthese in humanen Arteria mammaria interna Segmenten führt. Dieser Effekt wurde in vivo durch die Inhibierung der Xanthinoxidase, einer bedeutenden Quelle für ROS, bestätigt.

In den letzten Jahren gab es immer mehr Hinweise darauf, dass freie Sauerstoffradikale die Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen begünstigen können [93, 94, 138]. So zeigten Superoxidanionen eine verstärkte Kontraktion isolierter Basilararterien von Kaninchen [138]. Über den Mechanismus der mit Sauerstoffradikalen assoziierten Vasokonstriktion ist derzeit noch wenig bekannt. Die Vasokonstriktion könnte einerseits über die direkte Wirkung auf die glatten Muskelzellen erfolgen, aber ebenso auch indirekt über eine Steigerung der ET-Synthese. Weitere mögliche Erklärungsansätze beinhalten die konsekutive Reduktion des Vasodilatators NO über die Bildung von Peroxynitrit [96].

Die gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies beeinträchtigt die endotheliale Funktion und die damit verbundenen vaskulären Erkrankungen. Für verschiedene atherogene Bedingungen, wie Hypercholesterinämie, Diabetes und Hypertonie ist bekannt, dass sie die Produktion von ROS in der Gefäßwand steigern. Diese pathologischen Zustände sind assoziiert mit einer endothelialen Dysfunktion, die auf eine abnormale und exzessive Freisetzung von vasokonstriktori-schen Substanzen, zum Beispiel dem Endothelin, zurückgeführt werden kann. Für die oben genannten atherogenen Bedingungen fanden sich in Assoziation mit gesteigertem oxidativem Stress [82, 139, 140] erhöhte Endothelin-1 Spiegel [18, 98]. Zusätzlich konnte bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Arteriosklerose und akutem Koronarsyndrom gesteigerte Serum- und Gewebsendothelin Spiegel nachgewiesen werden [18, 141]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Exposition gegenüber kardiovaskulären Risikofaktoren, wie dem ox-LDL, zu einer erhöh-

ten Produktion und Freisetzung von ET-1 führte [142]. Erhöhte Endothelin-Spiegel im Plasma wurden bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen, wie der chronischen Herzinsuffizienz [143], beim Myokardinfarkt [144] und in humanen arteriosklerotisch veränderten Gefäßen [30] beschrieben. Da Endothelin-1 als starker Vasokonstriktor mit autokrin/parakriner Wirkungsweise bekannt ist, wird eine Modulation der Endothelin-1 Synthese durch freie Sauerstoffradikale angenommen. Damit könnten die Effekte der vasoaktiven Sauerstoffradikale partiell erklärt werden. Daher untersuchten wir den Effekt von oxidativem Stress, Radikalscavenger sowie Enzyminhibitoren auf die Endothelin-1 Synthese.

5.1. Effekte von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Big-ET-1 Konzentration in IMA Segmenten

Für die Versuche wurden Arteria mammaria interna Segmente verwendet, da in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Superoxidanionen-Produktion in Arterien größer als in Venen ist [136]. Das Ergebnis dieser vorliegenden Studie zeigt, dass die Big Endothelin-1 Konzentration durch Exposition gegenüber dem Sauerstoffradikal-generierenden System Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO) anstieg. Es konnte zusätzlich festgestellt werden, dass der Effekt dosisabhängig war. So betrug der Anstieg der mittleren Big ET-1 Konzentration unter 5 U/l XO ca. 20 % des Kontrollwertes, unter 15 U/l ca. 40 % sowie bei einer Konzentration von 30 U/l XO 75 % des Ausgangswertes. Die Ergebnisse für 5 U/l und 15 U/l waren signifikant. Unter 30 U/l XO konnte kein signifikanter Anstieg der Big ET-1 Konzentration festgestellt werden. Am ehestens ist dieses über ein toxischen Effekt der hohen Konzentration auf die Endothelzellen zu sehen. Der Konzentrationsanstieg war spezifisch durch die freien Sauerstoffradikale vermittelt. Die Spezifität wurde gesichert durch die Koinkubation mit Superoxiddismutase und Katalase, welche zu einer Inhibierung des Effektes der Xanthinoxidase führten. Dieser Effekt war ebenfalls dosisabhängig. So konnte unter 600 U/ml SOD und 750 U/ml CAT die unter Xanthinoxidase beobachtete Erhöhung der Big ET-1 Spiegel vollständig aufgehoben werden. Ein Beitrag unspezifischer Effekte des Sauerstoffradikal-generierenden Systems (z.B. durch Verunreinigung) war daher unwahr-

scheinlich. Damit zeigten die dargestellten Ergebnisse, dass oxidativer Stress zu einer gesteigerten Endothelin-Synthese führt.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Hughes und Mitarbeiter in einem Zellkulturmodell. Sie zeigten, dass ROS die Endothelin-1 Spiegel auf Transkriptions- und Proteinebene in Mesangiumzellen steigerten [104]. Frühere Untersuchungen über die Wirkung von oxidativem Stress auf die Endothelin-1 Synthese hatten widersprüchliche Ergebnisse [104, 145]. So zeigten Love et al. in bovinen Endothelzellen der Pulmonalarterien ein Absinken der ET-1 Konzentrationen nach Inkubation mit X/XO. Die Arbeitsgruppe verwendete Zellen der Passage 10-15, so dass dort veränderte Stoffwechselsituationen vorgefunden haben könnten [145]. Möglicherweise ist die Rolle der Endotheline in Pulmonalgefäßen auch anders zu bewerten als im Systemkreislauf.

Der Mechanismus der induzierten Steigerung des Endothelin-1 durch oxidativen Stress bleibt weiterhin unklar, jedoch scheinen mehrere Wege möglich. Als wichtiges regulatives Element der Endothelin-1 Synthese wird die Aktivierung des Endothelin-1 Promotors angesehen [146, 147]. Unsere Arbeitsgruppe zeigte eine Aktivierung des Endothelin-1 Promotors über die X/XO generierten freien Sauerstoffradikale. Dies führte zu einer Steigerung der Endothelin-1 Konzentration in den untersuchten humanumbilikalischen Endothelzellen [103]. Zu gleichen Ergebnissen kam unsere Arbeitsgruppe auch in der Studie mit Gefäßwandmuskelzellen [99]. Wie oxidativer Stress den ET-1 Promotor aktiviert, ist nur ansatzweise geklärt. Der ET-1 Promotor enthält verschiedene Bindungsstellen, welche durch freie Sauerstoffradikale aktiviert werden können. Ein bedeutsamer Regulator ist dabei das Calcium-Responsive Element (CaRE) [146]. Eine Beteiligung des Promotorelements CaRE an der Regulation der ET-1 Synthese ist daher denkbar. Es ist bekannt, dass freie Sauerstoffradikale mit dem Kalziummetabolismus interferieren und daraus eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration resultiert [95]. Die freien Sauerstoffradikale können die ET-1 Synthese potentiell durch eine Modulation von Proteinkinasen, der MAPK Familie oder durch eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie nukleären Faktor- κ B stimulieren [101]. Der NF- κ B reguliert die Expression verschiedener Genprodukte mit der Funktion von entzündlichen Reaktionen, Wachstums- und Adhäsionsprozessen, wie z.B. TNF- α [148]

und IL-1 [149]. Die Regulation der Endothelin-1 Synthese durch NF- κ B wurde in diabetischen Vaskulopathien vermutet [102].

Die präsentierten Daten zeigten zum ersten Mal eine durch oxidativen Stress induzierte Steigerung der intrazellulären ET-1 Synthese in humanen Arteria mammaria interna Segmenten, welche wahrscheinlich zu einer endothelialen Dysfunktion unter atherogenen Bedingungen beiträgt. Diese Resultate erklären zumindest partiell den Effekt der ROS induzierten Vasokonstriktion [138]. Der oxidative Stress könnte damit zu einer Aggravierung der lokalen Effekte des Endothelins, wie die Stimulation der Zellproliferation und Hypertrophie, beitragen.

5.2. Effekte von Angiotensin II auf die Big ET-1 Konzentration in IMA Segmenten

Um bestimmen zu können, welche Bedeutung Angiotensin II bei der Regulation der Endothelin-1 Synthese in humanen Arterien zukommt, wurde der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von AT II und Radikalscavengern untersucht. In diesen Experimenten wurden humane Arteria mammaria interna Segmente verwendet und eine Inkubationsdauer von 4 Stunden festgelegt.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Inkubation von humanen Arteria mammaria interna Segmenten mit Angiotensin II zu einer Steigerung der Big Endothelin-1 Konzentration gegenüber den basalen Werten führte. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. Die verwendeten Konzentrationen vom AT II waren gering und reflektierten damit physiologische Bedingungen. Zusätzlich wurde demonstriert, dass die Wirkung von AT II spezifisch auf die generierten freien Sauerstoffradikale zurückzuführen war, da eine Koinkubation mit den radikalkonvertierenden Enzymen Superoxiddismutase und Katalase den Big Endothelin-1 Konzentrationsanstieg inhibierte. Dieser Effekt stellte sich ebenfalls dosisabhängig dar. Unter der hohen Konzentration von 600 U/ml SOD und 750 U/ml CAT sank die Big ET-1 Konzentration sogar unterhalb des Kontrollwertes ab. Eine mögliche Erklärung ist, dass es auch in den für 4 Stunden im Wasserbad inkubierenden Kontrollgefäßen zu leichten oxidativen Stress-Situationen innerhalb der Gefäßwand kam. Die dabei

ohne Zugabe von Stimulatoren gebildeten ROS könnten ebenfalls die Endothelin Synthese stimuliert haben. Eine Zugabe von höheren Konzentrationen an SOD und CAT könnte somit eine eigenständige Superoxidanionenproduktion mit konvertiert haben. In Einklang mit unseren Ergebnissen konnten Barton et al. nach Exposition von humanen Endothelzellen mit AT II einen dosisabhängigen Anstieg der Endothelinkonzentration zeigen [32]. Zusätzlich wurde beobachtet, dass der Prozess der Interaktion von AT II mit ET in der Gefäßwand stattfindet und komplett durch den Einsatz von ET-Rezeptorblocker oder AT₁ Rezeptor Antagonisten aufgehoben werden konnte [54]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass AT II die Expression der Präproendothelin mRNA und das Protein in kultivierten humanen glatten Muskelzellen und Endothelzellen stimulierte [150-152]. Lopez et al. untersuchten die Rolle der Superoxidanionen auf die AT II induzierten renalen Effekte. Die Generierung der Superoxidanionen, induziert durch das AT II, führte zu einer renalen Vasokonstriktion, einerseits durch den direkten Effekt auf die glatten Gefäßmuskelzellen oder indirekt über die Steigerung der Endothelin Synthese [153].

Unsere Daten demonstrierten zum ersten Mal, die AT II induzierte Steigerung der Endothelin-1 Synthese in humanen Arteria mammaria interna Segmenten. Die präsentierten Ergebnisse unterstützen das Konzept, dass freie Sauerstoffradikale den Effekt von AT II auf die ET-1 Synthese vermitteln. Die Ergebnisse helfen die Assoziationen zwischen gesteigerter ET-1 Synthese in der Gefäßwand, gesteigerter oxidativer Stress und verstärkter Vasokonstriktion in Erkrankungen wie Atherosklerose [154] und Hypertonie [121] besser zu verstehen.

5.3. Effekte von Oxypurinol auf die Big ET-1 Konzentration im Serum von Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie

Die ischämische Kardiomyopathie ist ein entscheidender Faktor für die Morbidität und Mortalität von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen. Für die Pathophysiologie scheinen zwei Faktoren hauptverantwortlich zu sein: die endotheliale Dysfunktion sowie gesteigerter oxidativer Stress. Eine Strategie zur Therapie stellt die Inhibierung der Synthese der Superoxidanionen dar. Eine Quelle für die vaskuläre Superoxidproduktion ist die Xanthinoxidase. Somit könnte die Inhibie-

rung der Xanthinoxidase durch Oxypurinol die Generierung der Radikale effektiv verringern, mit dem Effekt einer verbesserten Endothelfunktion und gesteigerten myokardialen Kontraktilität. Wie in Abschnitt 2.3.4. bereits beschrieben, spielt das Endothelin eine große Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. So konnten erhöhte Endothelinspiegel im Plasma bei Patienten mit Herzinsuffizienz nachgewiesen werden [143, 155]. Die Plasma Big ET-1 Konzentrationen korrelieren dabei direkt positiv mit der Mortalität und erwiesen sich als genauere Parameter als die hämodynamischen Kennwerte. Der kurzzeitige Effekt der erhöhten Endotheline scheint, in Bezug auf die Aufrechterhaltung einer adäquaten Zirkulation am insuffizienten Herzen, von positiver Bedeutung sein. Eine langfristige Hochregulation des Endothelin Systems führt dagegen eher zu einer Progression der Herzinsuffizienz [33]. Die Modulation der Endothelin Synthese stellt damit ein bedeutsames Ziel in der Behandlung dieser Patientengruppe dar.

In der Studie an Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie stellten wir eine signifikante Reduktion der Big ET-1 Konzentration im Serum nach Oxypurinol Gabe fest. Die Variationen in den basalen (Pre-Dosis) ET-Konzentrationen kamen durch die heterogenen klinischen Charakteristiken der Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung zustande. Die Patienten wiesen Unterschiede in ihrer genetischen Veranlagung, in den kardialen Risikofaktoren, der Dauer und Schwere ihrer Erkrankung und ihrer medikamentösen Therapie auf. Mit dieser Studie konnten wir die Ergebnisse aus den ex vivo Versuchen an explantierten IMA Segmenten auch in vivo bestätigen. Das Resultat zeigte, dass das Xanthinoxidase generierende ROS System auch in vivo ein bedeutender Stimulus für die Synthese von Endothelin-1 darstellt. Limitierungen dieser Studie sind erstens die geringe Fallzahl und zweitens die Heterogenität des Kollektiv. Weitere Studien mit einer größeren Patientenzahl und Randomisierung werden benötigt.

Der potentielle therapeutische Nutzen der Senkung der ET-Konzentrationen liegt erstens in der Reduktion des toxischen Effektes auf die Kardiomyozyten, zweitens in der Prävention der Progression der Hypertrophie, drittens in der Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauches und viertens am positiven Effekt auf ventrikuläre Arrhythmien [33]. Bisherige Untersuchungen mit Oxypurinol zeigten kardioprotektive Effekte. Die Behandlung mit dem Purin Analogon ergaben eine Verbesse-

rung des Herzminutenvolumens, der linksventrikulären Funktion [156], eine Reduktion der Infarktgröße [157], eine Senkung der Inzidenz von Arrhythmien [158] und der endothelialen Dysfunktion [80, 133]. Der Mechanismus dieses protektiven Effektes der Xanthinoxidase Inhibition ist weiterhin unklar. Eine Möglichkeit stellt die in unserer Studie gezeigte Senkung der Endothelinspiegel dar. Es konnte gezeigt werden, dass selbst Patienten mit Harnsäurewerten im Normalbereich von einer Inhibierung der Xanthinoxidase Aktivität profitieren. Es kam zu einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion [133] und damit möglicherweise zu einer Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten zum ersten Mal eine durch die Gabe von Oxypurinol gesenkte Endothelinkonzentration im Serum. Allopurinol stellt einen nebenwirkungsarmen und kostengünstigen Weg zur Reduktion von oxidativem Stress und zur Verbesserung der endothelialen Dysfunktion in Patienten mit einer Herzinsuffizienz dar. Die Gabe von Allopurinol zeigt damit eine zusätzliche Therapiestrategie für diese Patientengruppe an.

5.4. Interaktionen von AT II, Oxidativem Stress und der Endothelin Expression

Die Effekte von AT II in der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und seine funktionelle Konsequenz in Bezug auf Endothelfunktion, Hypertonie, Endothelin Expression und Aktivierung von Superoxide ($\bullet\text{O}_2^-$) produzierenden Enzymen wie NAD(P)H Oxidase, wurden intensiv untersucht und beschrieben [85, 121, 122, 150, 159, 160]. Vasokonstriktion und Hypertonie resultieren aus AT II Aktionen am AT_1 Rezeptor. Inkubationen von Endothelzellen [151] und glatten Muskelzellen [152] mit AT II zeigten eine Stimulation der Präproendothelin Expression via Aktivierung am AT_1 Rezeptor und PKC (s. Abb. 5.1). Eine Mehrzahl von Studien hatten eindeutig gezeigt, dass AT II durch eine Aktivierung der NAD(P)H Oxidase, die Superoxidanionen Produktion stimulieren konnte [85, 121, 122].

Superoxide sind ein starker Stimulus für die Präproendothelin Expression in Endothelzellen [103] und glatten Muskelzellen [99], verbunden mit einer gesteigerten

Endothelin vermittelten Konstriktion des Gefäßsystems (s. Abb.5.1). Die Arbeitsgruppe von Wedgwood zeigte, dass Endothelin selbst die vaskuläre $\bullet\text{O}_2^-$ Produktion stimuliert [161]. Diese Ergebnisse verdeutlichen den Zusammenhang zwischen der ROS Produktion, dem ET und kardiovaskulären Störungen, wie z. B. Gefäßwandhypertrophie oder Arteriosklerose. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Tempol und Vitamin E, zwei Antioxidantien, die gesteigerten Plasma ET Konzentrationen nach chronischer AT II Verabreichung blocken kann [162]. In verschiedenen Zelltypen, z. B. Mukosazellen [163], VSMC [161] und Monozyten [164], scheint ET an einer positiven Feedbackschleife teilzunehmen. Es steigert die ROS Produktion einerseits und ist andererseits selbst gesteigert durch oxidativem Stress. Die genauen Mechanismen, welche einer Superoxidanionen-Produktion unterliegen, sind noch immer nicht genau erforscht. Einige Studien vermuten, dass die NAD(P)H Oxidase direkt aktiviert wird durch das ET [165, 166]. Gleichgehend mit den vorherigen Ergebnissen zeigte eine in vivo Behandlung mit LU 302872, ein nichtselektiver ET-A und ET-B Rezeptor Antagonist, eine kennzeichnende Verringerung der Superoxidanionenproduktion. Dieses unterstützte die Hypothese, dass dieser Prozess abhängig war von der lokalen ET Produktion. Die AT II induzierte Aktivierung der NAD(P)H Oxidase wurde durch die Blockade der ET Rezeptoren verhindert. Nur wenig ist bisher bekannt über die funktionelle Interaktion zwischen ET, oxidativem Stress und AT II. Die bisherigen Ergebnisse lassen starke und komplexe Assoziationen zwischen diesen drei Faktoren, in der Kontrolle von vaskulären Funktionen, vermuten. Basierend auf den oben genannten Feststellungen spielen die reaktiven Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle in der vermittelten endothelialen Dysfunktion unter AT II Behandlung. Die Ergebnisse unserer Arbeit untermauern die Bedeutung der Wechselwirkungen zwischen Angiotensin II, oxidativem Stress, Antioxidantien und Endothelin-1.

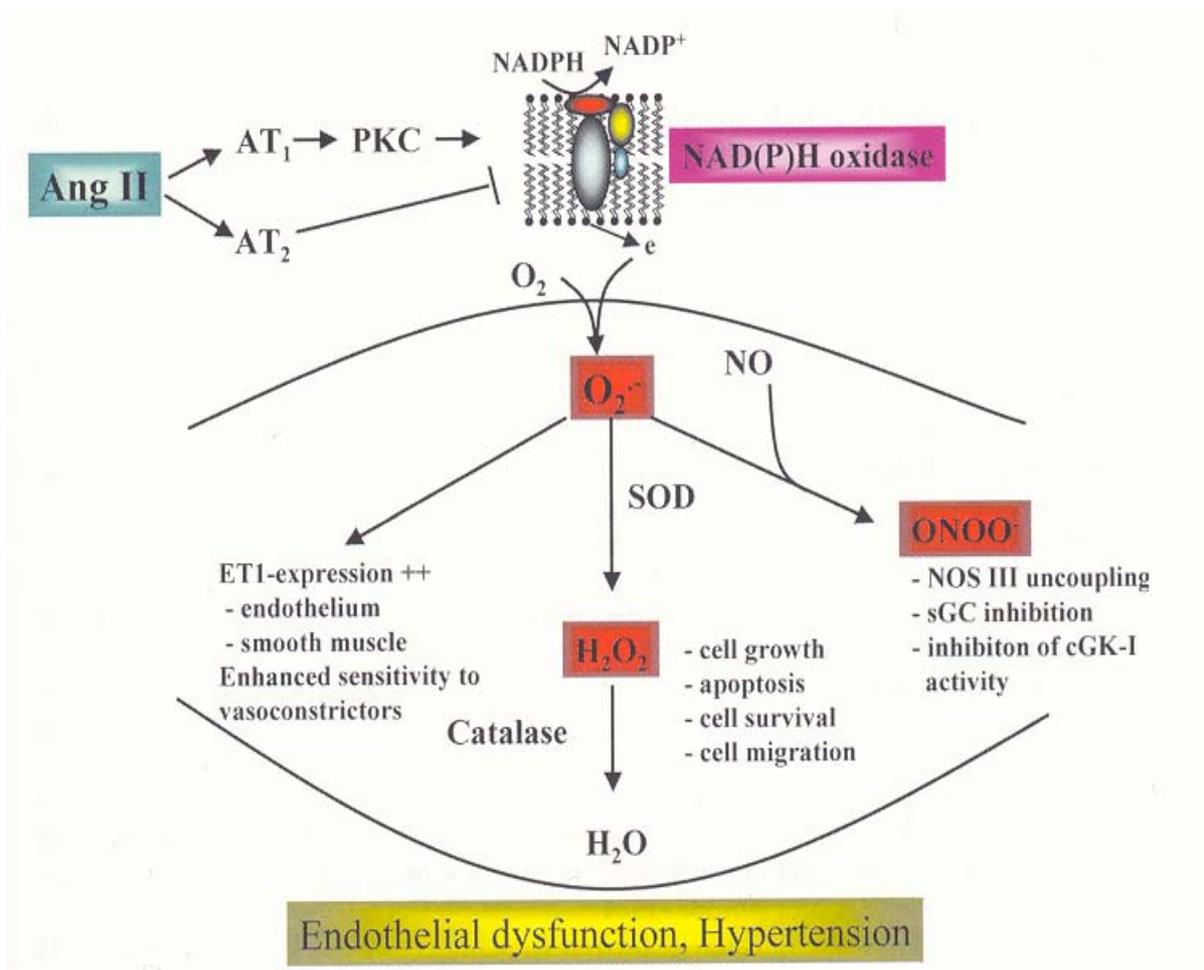


Abbildung 5.1: Stimulation des AT₁ Rezeptor aktiviert die NAD(P)H Oxidase über einen PKC abhängigen Mechanismus: Die Aktivierung der NAD(P)H Oxidase führt zu einer Steigerung der Superoxidationen ($\bullet\text{O}_2^-$) Produktion in den Endothel- und glatten Muskelzellen. Die Superoxide steigern die Expression des Präproendothelin in den Endothel und glatten Muskelzellen, welches zu einer gesteigerten ET-vermittelten Vasokonstriktion und ebenso zu einer Sensibilisierung der Gefäße gegenüber Vasokonstriktoragonisten, wie Norepinephrin und Serotonin führt. Die Superoxiddismutase (SOD) wandelt $\bullet\text{O}_2^-$ zum Hydrogenperoxid (H_2O_2) um, welches einen stimulierenden Effekt auf die Zellproliferation, Apoptose und Zellmigration hat. Superoxide reagieren mit Stickstoffmonoxid (NO) und produzieren das reaktive Peroxynitrit (ONOO^-). Die gesamten Mechanismen tragen zur endothelialen Dysfunktion und Hypertonie bei [167].

5.4.1. ET Modulation durch RAS

Wir konnten in der präsentierten Arbeit eine gesteigerte Endothelin Konzentration nach Stimulation mit AT II zeigen. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Forschungsgruppen. So wurden kultivierte Endothelzellen mit AT II stimuliert und zeigten eine gesteigerte Expression der Präpro-ET mRNA [159] (s. Abb. 5.2). Diese Ergebnisse wurden später auch durch eine in vivo Verabreichung von AT II bestätigt [168]. Moreau et al. und Barton et al. demonstrierten einen gesteigerten ET-1 Gehalt in Ratten, welche chronisch mit AT II behandelt wurden [54, 160]. Interessanterweise exprimieren kultivierte VSMC, Fibroblasten und Kardiomyozyten ebenfalls ET-1 nach Stimulation mit AT II und erweitern damit die Interaktionen auf nicht-Endothelzellen. Es wurde vermutet, dass AT II die Stabilität der Endothelin mRNA beeinflussen kann [152]. Durch Studien mit ACE-Inhibitoren fand man eine Reduktion der Plasma ET-1-Level bei Patienten mit Hypertonie [169], mit einer Herzinsuffizienz [170] und nach einem Myokardinfarkt [171]. Diese in vitro und in vivo Daten deuteten darauf hin, dass das RAS die endogene ET Produktion stimulieren kann. Das Endothelin erweitert wahrscheinlich seine eigene Produktion durch einen autokrinen Mechanismus über den ET-A Rezeptor, möglicherweise durch eine Steigerung der ECE Aktivität [160].

Der beste Weg um die genauen Zusammenhänge in kardiovaskulären Erkrankungen herauszufinden, ist die Verwendung von ET Rezeptor Antagonisten (ETRA) unter klinischen Studienbedingungen. Einer der ETRA, Bosentan, wurde kürzlich für die Behandlung der pulmonalen Hypertonie zugelassen. Seitdem herausgefunden wurde, dass AT II die Endothelinproduktion stimuliert, war es naheliegend den Beitrag von ET in AT II induzierten kardiovaskulären Effekten zu evaluieren.

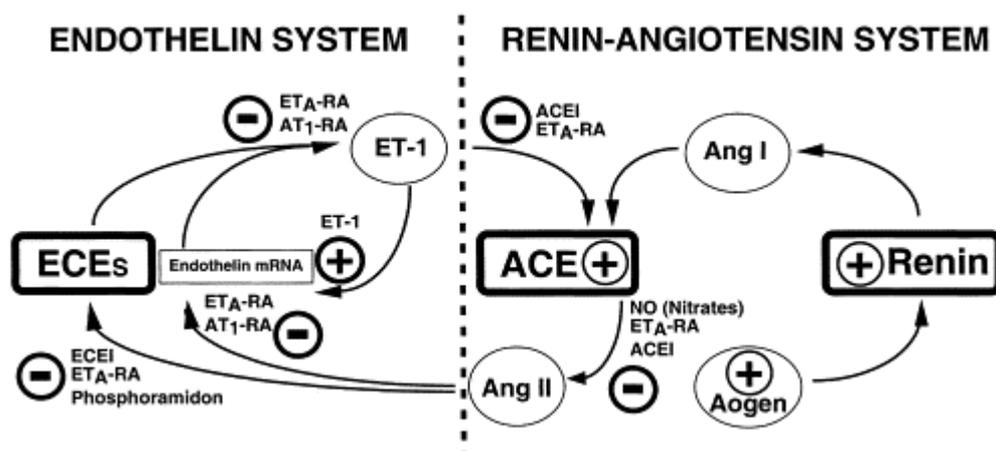


Abbildung 5.2: Lokale Regulation und Interaktion zwischen dem Renin-Angiotensin-System und dem Endothelin-System: Die Aktivierung des RAS führt zu erhöhten Spiegeln an Angiotensinogen (Aogen), Renin, ACE und einer gesteigerten Angiotensin-rezeptorvermittelten Vasoreaktivität. Angiotensin II steigert die Expression der Präproendothelin mRNA und die Aktivität des ECE. Die gesteigerte Konversion von Big ET-1 resultiert in einer gesteigerten ET-1 Protein Expression in den Gefäßen. ET-1 reguliert die ACE Aktivität über die ET-A Rezeptoren. Unterschiedliche Medikamente, welche derzeit für kardiovaskuläre Erkrankungen genutzt werden, können die Aktivität des RAS und ET-System antagonisieren. – Stimulation, + Inhibierung [172].

5.4.2. RAS Modulation durch ET Produktion

Konträr zum vorherigen Abschnitt diskutieren verschiedene Autoren das Konzept einer durch das Endothelin induzierten RAS Modulation (s. Abb. 5.2). Es wurde beschrieben, dass ET-1 die Konversion von AT I zu AT II erhöht [173]. Einige Studien zeigten eine Erhöhung der Renin Freisetzung aus den juxtaglomerulären Zellen durch das ET-1 und formulierten den Einfluss des ET-1 auf die Aktivität des zirkulierenden RAS [174]. Beachtet werden muss dabei, dass ET-1 eher als ein lokaler Regulator und nicht als ein zirkulierendes Hormon angesehen werden sollte. Seine Effekte auf die RAS Aktivität sollten nur dann berücksichtigt werden, wenn die lokale Synthese des RAS eine Rolle spielt. Zusätzlich wurde beschrieben, dass ET-1 die Produktion von Aldosteron stimuliert, äquipotent zum AT II in der Nebennierenrinde [174, 175].

5.4.3. Kombination von ETRA und Inhibitoren vom RAS

In Anbetracht der zahlreichen Interaktionen von ET und AT II erscheint die Kombination von Endothelin Rezeptor Antagonisten (ETRA) und Angiotensin Rezeptor Blocker (ARB) sinnvoll. Das RAS benötigt das ET System für verschiedene seiner kardiovaskulären Effekte. Für ACE Inhibitoren wurde eine Senkung der zirkulierenden ET Konzentrationen in unterschiedlichen pathologischen Bedingungen gezeigt. Dies lässt vermuten, dass eine Blockierung des RAS funktionell das ET System affiziert [171]. In einer Studie an hypertensiven Ratten zeigten Gardiner et al., dass durch eine Kombination von ARB und ETRA die Blutdrucksenkung verstärkt werden konnte. Die so behandelten Ratten erfuhren eine Reduktion des Blutdruckes um 60 mmHg [176]. Bohlender et al. konnten in hRen/hAgt transgenen Ratten zeigen, dass eine Behandlung mit low-dose ARB oder einer therapeutischen Dosis an ETRA einen kleinen Effekt auf den Blutdruck sowie eine hohe Mortalitätsrate nach 10 Wochen (42 %) hatte. Eine kombinierte Therapie hingegen normalisierte den Blutdruck und senkte die Mortalität in diesen Ratten [177]. Daher erscheint eine RAS Inhibierung in der Anwesenheit von ETRA effektiver. Zusätzlich zum hypotensiven Effekt kann die kombinierte Blockade der zwei Systeme die Endorganschäden limitieren. Dies geschieht indirekt durch eine Begünstigung der hämodynamischen Effekte oder direkt durch Blockade der Effekte der Peptide auf die Proteinsynthese und/oder ROS Generierung. Eine kombinierte Langzeitbehandlung mit ETRA und ACE Inhibitoren zeigte eine effektive Verbesserung in der Progression des Herzinsuffizienz nach einem Myokardinfarkt als eine Monotherapie [178].

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz, die einen ACE Inhibitor als Standardtherapie erhielten, verbesserte sich das hämodynamische Profil der Patienten nach Erhalt eines ETRA [179]. Die ETRA repräsentieren einen alternativen Zugang für die Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen, welche mit einer gesteigerten Aktivität des RAS assoziiert sind. Dieses lässt vermuten, dass diese kombinierte Therapie eine interessante alternative Therapie bereitstellt. Zusammenfassend lassen die Daten vermuten, dass eine kombinierte Therapie von RAS und ET Inhibitoren den potentiellen Nutzen einer jeden individuellen Behandlung vergrößern kann.

5.5. Bedeutung der Interaktionen für kardiovaskuläre Erkrankungen

Für die Klinik ergeben sich aus diesen Ergebnissen der Interaktionen mehrere Perspektiven. Die ausgeprägten vasokonstriktorischen und mitogenen Eigenschaften prädestinieren Endothelin als einen relevanten Faktor in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie und Herzinsuffizienz, wie auch für die Progression arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen.

5.5.1. Arterielle Hypertonie

Eine Erhöhung des arteriellen Blutdrucks ist ein globaler hämodynamischer Effekt, welcher mehr als nur die Balance zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation widerspiegelt. Ein wichtiger Parameter ist dabei das RAS. Verschiedene Mechanismen beeinflussen den Effekt von AT II und Aldosteron, wie z.B. die Regulation des renalen Natriums. Der Mechanismus der RAS-induzierten Hypertonie wurde früher allein dem vasokonstriktorischen Effekt des AT II und des mineralokortikoiden Effektes vom Aldosteron zugeschrieben. Neuere Studien haben einen zusätzlichen Mechanismus beschrieben. Die AT II Konzentrationen waren in den Modellen unterhalb der blutdrucksteigernden Spiegel. Daher musste ein anderer Mechanismus als die direkte AT II induzierte Vasokonstriktion für die Hypertonie verantwortlich sein. Es wurde postuliert, dass der oxidativer Stress und das ET in der langsamen AT II Antwort auf den Blutdruck involviert sind [180]. Das AT II steigert den oxidativen Stress und dieses bewirkt eine Stimulation der Endothelinsynthese. Die erhöhten ET-Spiegel vermitteln darauf die AT II induzierte Hypertonie. Ortiz und Kollegen beobachteten als erste eine signifikante Steigerung der ET-1 Konzentration in der Nierenvene von AT II infundierten hypertensiven Ratten. Die Steigerung konnte durch Antioxidantien verhindert werden [162]. Mögliche Erklärungen für die gesteigerten Endothelin-1 Spiegel unter AT II Gabe sind eine direkte Stimulation der Endothelin Expression [181] oder indirekt über die Steigerung des oxidativen Stresses, welche die NAD(P)H Oxidase involviert. Das ET kann wiederum selbst die NAD(P)H Oxidase aktivieren und damit die Superoxidionenproduktion verstärken [165]. Für ET-1 wurde zusätzlich eine Aktivierung des vaskulären ACE demonstriert [86]. Li et al. beschrieben einen Zusammenhang

zwischen ET-1 und der NAD(P)H Oxidase. Die Aktivierung der NAD(P)H Oxidase ist ET-1 gesteuert. Dieser Mechanismus ist ET-A Rezeptor abhängig, da eine Blockierung dieses Rezeptors zu einer Reduzierung der $\bullet\text{O}_2^-$ Level führte [182]. Diese Interaktionen von AT II und ET-1 können damit den Effekt von AT II auf die Blutdrucksteigerung potenzieren. Mit ACE-Inhibitoren und Angiotensin-Rezeptor-Blockern konnte eine Senkung des oxidativen Stress bewirkt werden, wie auch eine signifikante Reduktion von kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität (HOPE Studie) [183].

Diese Ergebnisse zusammen lassen vermuten, dass AT II den oxidativen Stress steigert. Die ROS können wiederum die ET-1 Spiegel erhöhen, welche dann zum beobachteten Phänomen der AT II induzierten Hypertonie beitragen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass in Modellen von AT II abhängiger Hypertonie, Antioxidantien und ET Rezeptorblocker den Blutdruck senken können [150, 159, 160].

5.5.2. Gefäßremodeling

AT II, ET-1 und freie Sauerstoffradikale sind trophische Faktoren, welche einen starken Einfluss auf die vaskuläre Struktur besitzen. Ein vaskuläres Remodeling hat Konsequenzen für die Systemeinheit. Ihre Veränderungen sind strukturell und nicht reversibel. Ihre Prävention und Regression ist bis heute eine therapeutische Herausforderung. Veränderungen in der Struktur der kleinen Arterien aufgrund von hämodynamischen Veränderungen oder vaskulären Remodeling können ebenso zur Aufrechterhaltung eines Bluthochdruckes beitragen [184, 185].

Es konnte gezeigt werden, dass ETRA vor einem AT II induzierten hypertrophischen Remodeling der kleinen Arterien schützen [56]. Zusätzlich wurde beschrieben, dass ET in der Entwicklung von AT II induzierter Hypertrophie involviert ist, jedoch nicht in der hauptsächlichen Phase. Ähnlich den hypotensiven Effekten von ETRA in AT II abhängigen Hypertoniemodell, scheint es ebenfalls wichtig zu sein, eine Behandlung frühzeitig zu starten [45].

5.6. Zusammenfassende und weiterführende Aspekte

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Interaktionen von Sauerstoffradikalen und Angiotensin II mit dem Endothelin-1 Metabolismus können zum Verständnis von zahlreichen beobachteten Phänomenen beitragen, welche eine Vaso-konstriktion unter oxidativem Stress beschreiben. Unsere Ergebnisse könnten weiterhin erklären, dass Sauerstoffradikale über die Steigerung der Endothelin Synthese auch andere lokale Endothelin-1 Effekte aggravierern. Die erhöhten Endothelin-1 Spiegel in den Arteria mammaria interna Gefäßen führen möglicherweise zu einer verstärkten Stimulation von Zellproliferation und Hypertrophie, wie sie in hypertensiven und hypercholesterinämischen Gefäßwandveränderungen beobachtet werden können.

Die Interaktionen zwischen Sauerstoffradikalen, Endothelin-1 und Angiotensin II sind möglicherweise noch komplexer als hier aufgeführt. Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Endothelin-1 Produktion in humanen Arteria mammaria interna Segmenten durch Sauerstoffradikale stimuliert wird. Andererseits scheinen Endotheline ebenfalls die Produktion von Sauerstoffradikalen induzieren zu können. Eine Endothelin-1 induzierte gesteigerte Generation von Superoxidanionen wurde u. a. in Endothelzellen [165] und in neutrophilen Granulozyten [186] nachgewiesen. Ebenso wurde gezeigt, dass Angiotensin II die Synthese von Endothelin-1 steigert. Das Endothelin-1 besitzt wiederum Einfluss auf die RAS Aktivität. Diese Mechanismen lassen ein Feedback-System erkennen, das zur Potenzierung der gewebsschädigenden Wirkung der Substanzengruppen beiträgt.

Interaktionen zwischen dem RAS und ET-System haben eine klinische Signifikanz in der Evaluation von kardiovaskulären Erkrankungen und ihrer jeweiligen Therapie. Das RAS hat viele Effekte am kardiovaskulären System, ersichtlich an den verschiedenen Indikationen für den Einsatz von ACE Inhibitoren, ARB und Aldosteron Antagonisten. Möglicherweise sind einige der positiven Effekte der ACE-Inhibitoren in kardiovaskulären Erkrankungen auf die günstige Modulation der Endothelin Spiegel zurückzuführen. Es bleibt weiterhin unklar, ob die beobachteten Veränderungen des Endothelin Stoffwechsels der kausale Ursprung für pathologische Veränderungen sind oder die Folge einer Anpassungsreaktion darstellen.

Weitere Untersuchungen mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten sollen zum besseren Verständnis der Effekte beitragen und die Frage nach Ursache oder Folge klären.

Eine Modulation der Endothelin-Wirkungen durch spezifische Antagonisten und Inhibitoren könnte langfristig eine verbesserte Therapieoption von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen darstellen. Solche ETRA zeigen einen neuen Therapieansatz zur Feinmodulierung des RAS in den Arterien und Nieren an. Zieht man einerseits die niedrige antihypertensive Wirksamkeit von ETRA aber andererseits ihre überlegende Eigenschaft die Endorganschäden zu limitieren in Betracht, können ETRA und Inhibitoren des RAS zu einer vorteilhaften Kombination verwendet werden. Gemeinsam können sie den therapeutischen Effekt maximieren.

Der oxidative Stress korreliert mit der endothelialen Dysfunktion, daher ist es begründet anzunehmen, dass eine antioxidative Therapie oder Methoden, welche die antioxidativen Mechanismen aufbauen, die endotheliale Dysfunktion verbessern. Die Interaktionen zwischen Endothelzellen und oxidativen Stress spielen eine bedeutende Rolle für die Vorhersage zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse. Weitere Studien werden benötigt, um noch genauer die Quellen und Signaltransduktionswege der ROS zu definieren. Auf diese Ergebnisse aufbauend können neue Strategien zur Limitierung der Morbidität und Mortalität in kardiovaskulären Erkrankungen entwickelt werden. Die drei am weitesten verbreiteten Medikamente für kardiovaskuläre Erkrankungen (HMG-CoA Reduktase Inhibitoren, ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor Antagonisten) supprimieren die vaskuläre ROS Produktion. Es bleibt zu beweisen, ob der klare therapeutische Nutzen dieser Medikamente auch teilweise über die Suppression des oxidativen Stress und der damit reduzierten ET-1 Spiegel zurückzuführen ist.

Die neue Erkenntnis der Rolle der XO in der Pathophysiologie von kardiovaskulären Erkrankung und insbesondere in der Herzinsuffizienz war Gegenstand zahlreicher Studien in den vergangenen Jahren. Um den therapeutischen Effekt von Xanthinoxidase Inhibitoren besser überprüfen zu können, sind Langzeitstudien notwendig. Derzeit läuft eine groß angelegte Studie (A Phase II-III Prospektive, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Efficacy and Safety Study of Oxy-

purinol Added to Standard Therapy in Patients with NYHA Class II-IV Congestive Heart Failure OPT-CHF), in der ein positiver Effekt des XO-Inhibitors im Management der Therapie der Herzinsuffizienz überprüft werden soll. Die Ergebnisse lassen auf eine weitere Therapiemöglichkeit dieser Patientengruppe hoffen.

6. Zusammenfassung

Endotheline, Sauerstoffradikale und Angiotensin II sind bedeutende Faktoren in der Physiologie und Pathophysiologie von Gefäßen. Sie regulieren den Vasotonus und spielen eine Rolle bei strukturellen Umbauvorgängen innerhalb der Gefäßwände. Endothelin-1 ist ein autokrin/parakrines wirkendes Hormon mit vaso-konstriktorischen, proliferativen und mitogenen Eigenschaften und interagiert mit anderen vasoaktiven Substanzen wie AT II. Freie Sauerstoffradikale agieren als funktionelle vasomotorische Agonisten der Endotheline und steigern die ET-1 Synthese in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen. Das AT II vermittelt seine Effekte teilweise über die Endothelinachse und verstärkt den oxidativen Stress. Aufgrund der zahlreichen Interaktionen untersuchten wir erstens die Effekte von reaktiven Sauerstoffintermediaten und AT II auf den ET-1 Metabolismus in humanen Arteria mammaria interna Gefäßsegmenten und zweitens den Effekt von Oxypurinol auf den ET-1 Spiegel in einer in-vivo Studie mit Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie.

Als ROS generierendes System wurde Xanthin/Xanthinoxidase verwendet. Die Quantifizierung der Big Endothelin-1 Konzentration erfolgte mit der Technik des ELISA. Die Inkubation der IMA Segmente mit X/XO sowie AT II führte zu einem signifikanten Anstieg der Big ET-1 Konzentration. Dieser Effekt war konzentrationsabhängig. Die Infusion von Oxypurinol führte bei den Patienten zu einem signifikanten Abfall der Serumspiegel des Big Endothelin-1.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass exogen applizierter oxidativer Stress, generiert durch das System X/XO und AT II, die Endothelinsynthese in humanen IMA Segmenten stimuliert. Dieser Effekt war spezifisch für Superoxid-anionen, da die Koinkubation mit Superoxiddismutase und Katalase in einer signifikanten Reduktion der Big ET-1 Konzentration resultierte. Der stimulierende Effekt von freien Sauerstoffradikalen, generiert durch das Enzym Xanthinoxidase, auf die Endothelinsynthese konnte in der humanen in-vivo Studie bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können dazu beitragen, die mit gesteigertem oxidativen Stress assoziierten erhöhten Endothelinpiegel unter pathologischen Bedingungen, wie Hypercholesterinämie, Hypertonie, Herzinsuffizienz und Arteriosklerose zu klären.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schmailzl, K., *Harrisons Innere Medizin*. Blackwell Wissenschafts-Verlag dt. Ausgabe, 1995. **13.Auflage**: p. 1121-1340.
2. Busse, R., I. Fleming, and M. Hecker, *Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation*. Eur Heart J, 1993. **14 Suppl I**: p. 2-9.
3. Fichtlscherer, S. and A.M. Zeiher, [*Endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndrome*]. Herz, 1999. **24(7)**: p. 534-43.
4. Harrison, K.L., et al., *Synthesis, characterization, and immunochemical detection of O6-(carboxymethyl)-2'-deoxyguanosine: a DNA adduct formed by nitrosated glycine derivatives*. Chem Res Toxicol, 1997. **10(6)**: p. 652-9.
5. Kojda, G. and D. Harrison, *Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **43(3)**: p. 562-71.
6. McIntyre, M., D.F. Bohr, and A.F. Dominiczak, *Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion*. Hypertension, 1999. **34(4 Pt 1)**: p. 539-45.
7. Romero, J.C. and J.F. Reckelhoff, *State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension*. Hypertension, 1999. **34(4 Pt 2)**: p. 943-9.
8. Riede, U.S., HE, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1995. **4. Auflage**: p. 436-440.
9. Cayatte, A.J., et al., *Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits*. Arterioscler Thromb, 1994. **14(5)**: p. 753-9.
10. Hamon, M., et al., *Long-term oral administration of L-arginine reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury*. Circulation, 1994. **90(3)**: p. 1357-62.
11. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1986. **315(17)**: p. 1046-51.
12. Tanner, F.C., et al., *Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide*. Circulation, 1991. **83(6)**: p. 2012-20.
13. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87(13)**: p. 5193-7.
14. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and prolifera-*

- tion of cultured rat vascular smooth muscle cells.* J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1774-7.
15. Gauthier, T.W., K.L. Davenpeck, and A.M. Lefer, *Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion.* Am J Physiol, 1994. **267**(4 Pt 1): p. G562-8.
 16. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
 17. Lerman, A., et al., *Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans.* Circulation, 1995. **92**(9): p. 2426-31.
 18. Lerman, A., et al., *Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis.* N Engl J Med, 1991. **325**(14): p. 997-1001.
 19. Zeiher, A.M., *Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischaemia or epiphenomenon?* Lancet, 1996. **348** Suppl 1: p. s10-2.
 20. Werns, S.W., et al., *Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease.* Circulation, 1989. **79**(2): p. 287-91.
 21. McLenachan, J.M., et al., *Loss of flow-mediated endothelium-dependent dilation occurs early in the development of atherosclerosis.* Circulation, 1991. **84**(3): p. 1273-8.
 22. Reddy, K.G., et al., *Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis.* J Am Coll Cardiol, 1994. **23**(4): p. 833-43.
 23. Schächinger, V., M.B. Britten, and A.M. Zeiher, *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease.* Circulation, 2000. **101**(16): p. 1899-906.
 24. Halcox, J.P., et al., *Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction.* Circulation, 2002. **106**(6): p. 653-8.
 25. Al Suwaidi, J., et al., *Pathophysiology, diagnosis, and current management strategies for chest pain in patients with normal findings on angiography.* Mayo Clin Proc, 2001. **76**(8): p. 813-22.
 26. Heitzer, T., et al., *Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease.* Circulation, 2001. **104**(22): p. 2673-8.
 27. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.* Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
 28. Hickey, K.A., et al., *Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells.* Am J Physiol, 1985. **248**(5 Pt 1): p. C550-6.

29. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
30. Bacon, C.R., N.R. Cary, and A.P. Davenport, *Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta*. Circ Res, 1996. **79**(4): p. 794-801.
31. Gardiner, S.M., et al., *Cardiovascular effects of endothelin-1 and endothelin antagonists in conscious, hypertensive ((mRen-2)27) rats*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(8): p. 1732-8.
32. Lüscher, T.F. and M. Barton, *Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs*. Circulation, 2000. **102**(19): p. 2434-40.
33. Miyauchi, T. and T. Masaki, *Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system*. Annu Rev Physiol, 1999. **61**: p. 391-415.
34. Hahn, A.W., et al., *Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function*. Cell Regul, 1990. **1**(9): p. 649-59.
35. Rubanyi, G.M. and M.A. Polokoff, *Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(3): p. 325-415.
36. Simonson, M.S. and W.H. Herman, *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, 1993. **268**(13): p. 9347-57.
37. Inoue, A., et al., *The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression*. J Biol Chem, 1989. **264**(25): p. 14954-9.
38. de Nucci, G., et al., *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, 1988. **85**(24): p. 9797-800.
39. Yoshimoto, S., et al., *Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells*. Stroke, 1991. **22**(3): p. 378-83.
40. Wagner, O.F., et al., *Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16066-8.
41. Wei, C.M., et al., *Endothelin in human congestive heart failure*. Circulation, 1994. **89**(4): p. 1580-6.
42. Yanagisawa, M., et al., *Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(18): p. 6964-7.

43. Sharifi, A.M. and E.L. Schiffrin, *Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism*. J Hypertens, 1997. **15**(12 Pt 1): p. 1441-8.
44. Shichiri, M., et al., *Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells*. Hypertension, 1997. **30**(5): p. 1198-203.
45. Dao, H.H., et al., *Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries*. J Hypertens, 2001. **19**(10): p. 1801-12.
46. Inoue, A., et al., *The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2863-7.
47. Shinmi, O., et al., *Endothelin-3 is a novel neuropeptide: isolation and sequence determination of endothelin-1 and endothelin-3 in porcine brain*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **164**(1): p. 587-93.
48. Lee, M.E., et al., *Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10446-50.
49. Levin, E.R., *Endothelins*. N Engl J Med, 1995. **333**(6): p. 356-63.
50. Harrison, V.J., et al., *Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(14): p. 6344-8.
51. Xu, D., et al., *ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1*. Cell, 1994. **78**(3): p. 473-85.
52. Schiffrin, E.L. and R.M. Touyz, *Vascular biology of endothelin*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **32** Suppl 3: p. S2-13.
53. Seo, B., et al., *Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels*. Circulation, 1994. **89**(3): p. 1203-8.
54. Moreau, P., et al., *Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1593-7.
55. Aramori, I. and S. Nakanishi, *Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 12468-74.
56. Moreau P, N.E., Takase H, Lüscher TF, *Local regulation of vascular function: focus on endothelium-dependent mechanisms in normotension, hypertension and atherosclerosis*. Pathophysiology of Hypertension, 1997: p. 975-1006.
57. Hirata, Y., et al., *Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1367-73.

58. Simonson, M.S., *Endothelins: multifunctional renal peptides*. *Physiol Rev*, 1993. **73**(2): p. 375-411.
59. Kähler, J., et al., [*Endothelins in cardiovascular diseases*]. *Z Kardiol*, 1997. **86**(6): p. 406-16.
60. Krum, H., et al., *Role of endothelin in the exercise intolerance of chronic heart failure*. *Am J Cardiol*, 1995. **75**(17): p. 1282-3.
61. Pacher, R., et al., *Plasma big endothelin-1 concentrations in congestive heart failure patients with or without systemic hypertension*. *Am J Cardiol*, 1993. **71**(15): p. 1293-9.
62. Kiowski, W., et al., *Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure*. *Lancet*, 1995. **346**(8977): p. 732-6.
63. Kohno, M., et al., *Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension*. *Am J Med*, 1990. **88**(6): p. 614-8.
64. Shichiri, M., et al., *Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure*. *Hypertension*, 1990. **15**(5): p. 493-6.
65. Rubanyi, G.M. and L.H. Botelho, *Endothelins*. *Faseb J*, 1991. **5**(12): p. 2713-20.
66. Clozel, M., *Endothelin sensitivity and receptor binding in the aorta of spontaneously hypertensive rats*. *J Hypertens*, 1989. **7**(11): p. 913-7.
67. Deng, L.Y. and E.L. Schiffrin, *Effect of antihypertensive treatment on response to endothelin of resistance arteries of hypertensive rats*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993. **21**(5): p. 725-31.
68. Nakamichi, K., et al., *Different distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary tissues revealed by the novel selective ligands BQ-123 and [Ala^{1,3,11,15}]ET-1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **182**(1): p. 144-50.
69. Zeiher, A.M., et al., *Increased tissue endothelin immunoreactivity in atherosclerotic lesions associated with acute coronary syndromes*. *Lancet*, 1994. **344**(8934): p. 1405-6.
70. Borries, M., et al., [*Endothelin and big endothelin in coronary heart disease and acute coronary syndromes*]. *Z Kardiol*, 1996. **85**(10): p. 761-7.
71. Yasuda, M., et al., *Circulating immunoreactive endothelin in ischemic heart disease*. *Am Heart J*, 1990. **119**(4): p. 801-6.
72. Watanabe, T., et al., *Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarct size in rats*. *Circ Res*, 1991. **69**(2): p. 370-7.
73. Wallace, D.C. and S. Melov, *Radicals r'aging*. *Nat Genet*, 1998. **19**(2): p. 105-6.

74. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
75. Ferrari, R., *Oxygen-free radicals at myocardial level: effects of ischaemia and reperfusion*. Adv Exp Med Biol, 1994. **366**: p. 99-111.
76. Moslen, M.T., *Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis*. Adv Exp Med Biol, 1994. **366**: p. 17-27.
77. Zou, M.H., C. Shi, and R.A. Cohen, *Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite*. J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 817-26.
78. Guthikonda, S., et al., *Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 416-21.
79. Spiekermann, S., et al., *Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation*. Circulation, 2003. **107**(10): p. 1383-9.
80. Cardillo, C., et al., *Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients*. Hypertension, 1997. **30**(1 Pt 1): p. 57-63.
81. White, C.R., et al., *Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8745-9.
82. Ohara, Y., T.E. Peterson, and D.G. Harrison, *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2546-51.
83. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
84. Mollnau, H., et al., *Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. E58-65.
85. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. **74**(6): p. 1141-8.
86. Warnholtz, A., et al., *Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system*. Circulation, 1999. **99**(15): p. 2027-33.
87. Jones, S.A., et al., *Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 2): p. H1626-34.
88. Touyz, R.M., et al., *Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resis-*

- tance arteries: regulation by angiotensin II.* Circ Res, 2002. **90**(11): p. 1205-13.
89. Nunes, G.L., et al., *Vitamins C and E inhibit O₂- production in the pig coronary artery.* Circulation, 1997. **96**(10): p. 3593-601.
90. Schneider, J.E., et al., *Probucol decreases neointimal formation in a swine model of coronary artery balloon injury. A possible role for antioxidants in restenosis.* Circulation, 1993. **88**(2): p. 628-37.
91. Berk, B.C., *Redox signals that regulate the vascular response to injury.* Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 810-7.
92. Wu, R., et al., *Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats.* J Hypertens, 2001. **19**(4): p. 741-8.
93. Katusic, Z.S. and P.M. Vanhoutte, *Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor.* Am J Physiol, 1989. **257**(1 Pt 2): p. H33-7.
94. Mehta, J.L., et al., *Role of superoxide radicals in anoxia reoxygenation-mediated vascular contraction.* Life Sci, 1991. **49**(23): p. 1739-46.
95. Wang, S.Y., J.R. Clague, and G.A. Langer, *Increase in calcium leak channel activity by metabolic inhibition or hydrogen peroxide in rat ventricular myocytes and its inhibition by polycation.* J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 211-22.
96. Gryglewski, R.J., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor.* Nature, 1986. **320**(6061): p. 454-6.
97. Mezzetti, A., et al., *Increased systemic oxidative stress after elective endarterectomy: relation to vascular healing and remodeling.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2659-65.
98. Hassan, M., et al., *Gastric mucosal injury induced by local ischemia-reperfusion in rats. Role of endogenous endothelin-1 and free radical.* Dig Dis Sci, 1997. **42**(7): p. 1375-80.
99. Kähler, J., et al., *Oxidative stress increases endothelin-1 synthesis in human coronary artery smooth muscle cells.* J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38**(1): p. 49-57.
100. Saito, T., et al., *Coordinate regulation of endothelin and adrenomedullin secretion by oxidative stress in endothelial cells.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(3): p. H1364-71.
101. Geng, Z., Y. Rong, and B.H. Lau, *S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells.* Free Radic Biol Med, 1997. **23**(2): p. 345-50.

102. Bierhaus, A., et al., *Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells.* Diabetes, 1997. **46**(9): p. 1481-90.
103. Kähler, J., et al., *Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter.* J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(8): p. 1429-37.
104. Hughes, A.K., et al., *Effect of reactive oxygen species on endothelin-1 production by human mesangial cells.* Kidney Int, 1996. **49**(1): p. 181-9.
105. Prasad, M.R., R.M. Jones, and D.L. Kreutzer, *Release of endothelin from cultured bovine endothelial cells.* J Mol Cell Cardiol, 1991. **23**(6): p. 655-8.
106. Saito, T., et al., *Oxidative stress suppresses the endothelial secretion of endothelin.* J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **31 Suppl 1**: p. S345-7.
107. Tigerstedt and Bergman, *Niere und Kreislauf.* Skand Arch Physiol, 1898. **8**: p. 223-238.
108. Page and Helmer, *A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator.* J Exp Med, 1940. **71**: p. 29-41.
109. Phillips, M.I., E.A. Speakman, and B. Kimura, *Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems.* Regul Pept, 1993. **43**(1-2): p. 1-20.
110. Timmermans, P.B., et al., *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists.* Pharmacol Rev, 1993. **45**(2): p. 205-51.
111. Muller, D.N. and F.C. Luft, *The renin-angiotensin system in the vessel wall.* Basic Res Cardiol, 1998. **93 Suppl 2**: p. 7-14.
112. Kato, H., et al., *Regulation of vascular angiotensin release.* Hypertension, 1993. **21**(4): p. 446-54.
113. Nakamura, A., et al., *Regulation of liver angiotensinogen and kidney renin mRNA levels by angiotensin II.* Am J Physiol, 1990. **258**(1 Pt 1): p. E1-6.
114. Volpe, M., et al., *The renin-angiotensin system as a risk factor and therapeutic target for cardiovascular and renal disease.* J Am Soc Nephrol, 2002. **13 Suppl 3**: p. S173-8.
115. Mustafa, T., et al., *Characterization of the AT(4) receptor in a human neuroblastoma cell line (SK-N-MC).* J Neurochem, 2001. **76**(6): p. 1679-87.
116. Ruiz-Ortega, M., et al., *Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field.* Hypertension, 2001. **38**(6): p. 1382-7.
117. Lohmeier, T.E., et al., *Baroreflexes prevent neurally induced sodium retention in angiotensin hypertension.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(4): p. R1437-48.

118. Loutzenhiser, R., et al., *Characterization of the renal microvascular effects of angiotensin II antagonist, DuP 753: studies in isolated perfused hydronephrotic kidneys*. Am J Hypertens, 1991. **4**(4 Pt 2): p. 309S-314S.
119. Morgan, H.E. and K.M. Baker, *Cardiac hypertrophy. Mechanical, neural, and endocrine dependence*. Circulation, 1991. **83**(1): p. 13-25.
120. Kim, S. and H. Iwao, *Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 11-34.
121. Rajagopalan, S., et al., *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1916-23.
122. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways*. J Hypertens, 2001. **19**(7): p. 1245-54.
123. Cifuentes, M.E., et al., *Upregulation of p67(phox) and gp91(phox) in aortas from angiotensin II-infused mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(5): p. H2234-40.
124. Wang, H.D., et al., *Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice*. Circ Res, 2001. **88**(9): p. 947-53.
125. Brandes, R.P., et al., *The vascular NADPH oxidase subunit p47phox is involved in redox-mediated gene expression*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(11): p. 1116-22.
126. Pueyo, M.E., et al., *Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 1): p. C214-20.
127. Sohn, H.Y., et al., *Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(4): p. 667-72.
128. Dijkhorst-Oei, L.T., et al., *Acute simultaneous stimulation of nitric oxide and oxygen radicals by angiotensin II in humans in vivo*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **33**(3): p. 420-4.
129. Cozza, E.N., S. Chiou, and C.E. Gomez-Sanchez, *Endothelin-1 potentiation of angiotensin II stimulation of aldosterone production*. Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 2): p. R85-9.
130. Ito, H., et al., *Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 398-403.

131. Kähler J, B.S., *Captopril reduces endothelin-1 release from human umbilical vein endothelial cells by reduction of angiotensin II synthesis*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**: p. 104A.
132. Butler, R., et al., *Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension*. Hypertension, 2000. **35**(3): p. 746-51.
133. Farquharson, C.A., et al., *Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure*. Circulation, 2002. **106**(2): p. 221-6.
134. Biomedica, *Big Endothelin*. 2002, Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG.
135. Kähler, J., et al., *Endothelin-1 mRNA and protein in vascular wall cells is increased by reactive oxygen species*. Clin Sci (Lond), 2002. **103 Suppl 48**: p. 176S-178S.
136. Berry, C., et al., *Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries*. Circulation, 2000. **101**(18): p. 2206-12.
137. Nakazono, K., et al., *Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(22): p. 10045-8.
138. Katusic, Z.S., et al., *Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery*. Am J Physiol, 1993. **264**(3 Pt 2): p. H859-64.
139. Givertz, M.M. and W.S. Colucci, *New targets for heart-failure therapy: endothelin, inflammatory cytokines, and oxidative stress*. Lancet, 1998. **352 Suppl 1**: p. SI34-8.
140. Suzuki, H., et al., *In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography*. Hypertension, 1995. **25**(5): p. 1083-9.
141. Zeiher, A.M., et al., *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, 1995. **91**(4): p. 941-7.
142. Martin-Nizard, F., et al., *Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin*. FEBS Lett, 1991. **293**(1-2): p. 127-30.
143. McMurray, J.J., et al., *Plasma endothelin in chronic heart failure*. Circulation, 1992. **85**(4): p. 1374-9.
144. Miyauchi, T., et al., *Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction*. Lancet, 1989. **2**(8653): p. 53-4.

145. Love, G.P. and A.K. Keenan, *Cytotoxicity-associated effects of reactive oxygen species on endothelin-1 secretion by pulmonary endothelial cells*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **24**(9): p. 1437-45.
146. Paul, M., et al., *Characterization and functional analysis of the rat endothelin-1 promoter*. *Hypertension*, 1995. **25**(4 Pt 2): p. 683-93.
147. Zoja, C., et al., *Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by transforming growth factor-beta, thrombin, and a thromboxane A2 analogue*. *Lab Invest*, 1991. **64**(1): p. 16-20.
148. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. *Annu Rev Immunol*, 1994. **12**: p. 141-79.
149. Hiscott, J., et al., *Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(10): p. 6231-40.
150. Imai, T., et al., *Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells*. *Hypertension*, 1992. **19**(6 Pt 2): p. 753-7.
151. Chua, B.H., et al., *Regulation of endothelin-1 mRNA by angiotensin II in rat heart endothelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1178**(2): p. 201-6.
152. Sung, C.P., et al., *Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **271**(1): p. 429-37.
153. Lopez, B., et al., *Role of superoxide in modulating the renal effects of angiotensin II*. *Hypertension*, 2003. **42**(6): p. 1150-6.
154. Miller, F.J., Jr., et al., *Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis*. *Circ Res*, 1998. **82**(12): p. 1298-305.
155. Hiroe, M., et al., *Plasma endothelin-1 levels in idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Am J Cardiol*, 1991. **68**(10): p. 1114-5.
156. Stewart, J.R., et al., *Prevention of free radical-induced myocardial reperfusion injury with allopurinol*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1985. **90**(1): p. 68-72.
157. Chambers, D.E., et al., *Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia*. *J Mol Cell Cardiol*, 1985. **17**(2): p. 145-52.
158. Manning, A.S., D.J. Coltart, and D.J. Hearse, *Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol*. *Circ Res*, 1984. **55**(4): p. 545-8.
159. Emori, T., et al., *Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin*. *Hypertension*, 1991. **18**(2): p. 165-70.

160. Barton, M., et al., *Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **238**(3): p. 861-5.
161. Wedgwood, S., R.W. Dettman, and S.M. Black, *ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **281**(5): p. L1058-67.
162. Ortiz, M.C., et al., *Antioxidants block angiotensin II-induced increases in blood pressure and endothelin*. *Hypertension*, 2001. **38**(3 Pt 2): p. 655-9.
163. Oktar, B.K., et al., *Endothelin-1-induced PMN infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **279**(3): p. G483-91.
164. Huribal, M., et al., *Endothelin-stimulated monocyte supernatants enhance neutrophil superoxide production*. *Shock*, 1994. **1**(3): p. 184-7.
165. Duerschmidt, N., et al., *Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **269**(3): p. 713-7.
166. Fei, J., et al., *Endothelin-1 and smooth muscle cells: induction of jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(5): p. 1244-9.
167. Unger, T., *Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade*. *J Hypertens*, 2003. **21 Suppl 6**: p. S3-7.
168. Dohi, Y., et al., *Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries*. *Hypertension*, 1992. **19**(2): p. 131-7.
169. Horky, K., et al., *Plasma concentrations of some cardiovascular humoral factors in essential hypertension and their changes during the treatment with converting enzyme inhibitor lisinopril*. *Sb Lek*, 1993. **94**(2): p. 155-61.
170. Galatius-Jensen, S., et al., *Plasma endothelin in congestive heart failure: a predictor of cardiac death?* *J Card Fail*, 1996. **2**(2): p. 71-6.
171. Di Pasquale, P., et al., *Early captopril treatment reduces plasma endothelin concentrations in the acute and subacute phases of myocardial infarction: a pilot study*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1997. **29**(2): p. 202-8.
172. Barton, M., et al., *Obesity-associated activation of angiotensin and endothelin in the cardiovascular system*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(6): p. 826-37.
173. Rajagopalan, S., et al., *Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension*. *Hypertension*, 1997. **30**(1 Pt 1): p. 29-34.
174. Rossi, G.P., et al., *Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system*. *Cardiovasc Res*, 1999. **43**(2): p. 300-7.

175. Rossi, G.P., et al., *Endothelin-1 stimulates steroid secretion of human adrenocortical cells ex vivo via both ETA and ETB receptor subtypes*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(10): p. 3445-9.
176. Gardiner, S.M., et al., *Haemodynamic effects of losartan and the endothelin antagonist, SB 209670, in conscious, transgenic ((mRen-2)27), hypertensive rats*. Br J Pharmacol, 1995. **116**(4): p. 2237-44.
177. Bohlender, J., et al., *Synergistic effects of AT(1) and ET(A) receptor blockade in a transgenic, angiotensin II-dependent, rat model*. Hypertension, 2000. **35**(4): p. 992-7.
178. Fraccarollo, D., et al., *Cardioprotection by long-term ET(A) receptor blockade and ACE inhibition in rats with congestive heart failure: mono- versus combination therapy*. Cardiovasc Res, 2002. **54**(1): p. 85-94.
179. Sutsch, G., et al., *Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure*. Circulation, 1998. **98**(21): p. 2262-8.
180. Ortiz, M.C., et al., *Role of endothelin and isoprostanes in slow pressor responses to angiotensin II*. Hypertension, 2001. **37**(2 Part 2): p. 505-10.
181. Alexander, B.T., et al., *Enhanced renal expression of preproendothelin mRNA during chronic angiotensin II hypertension*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(5): p. R1388-92.
182. Li, J.S., et al., *Effect of endothelin antagonism on blood pressure and vascular structure in renovascular hypertensive rats*. Am J Physiol, 1996. **271**(1 Pt 2): p. H88-93.
183. Yusuf, S., et al., *Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 2000. **342**(3): p. 154-60.
184. Heagerty, A.M., et al., *Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth*. Hypertension, 1993. **21**(4): p. 391-7.
185. Mulvany, M.J., et al., *Vascular remodeling*. Hypertension, 1996. **28**(3): p. 505-6.
186. Ishida, K., K. Takeshige, and S. Minakami, *Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**(2): p. 496-500.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
ACE	Angiotensin converting enzyme
ANP	Atrial natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
ARB	Angiotensin Rezeptor Blocker
AT	Angiotensin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	zyklische Adenosin Monophosphat
CaRE	Kalzium-Responsive Element
CAT	Katalase
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECE	Endothelin converting enzyme
EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylene diamine Tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
ET	Endothelin
ETRA	Endothelin Rezeptor Antagonisten
HCl	Salzsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethansulfonic acid]
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HOPE	Heart Outcomes Prevention Evaluation
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMA	Arteria mammaria interna
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
KCl	Kaliumchlorid

KHK	Koronare Herzkrankheit
K_2HPO_4	Kaliumhydrogenphosphat
LDL	Low density Lipoprotein
LOX	Oxidierter LDL Rezeptor
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MCP	Monozyte chemoattractant protein
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Reduzierte Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid- (Phosphat)
$NaHCO_3$	Natriumhydrogenkarbonat
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	nukleärer Faktor- κ B
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthetase
O_2	Sauerstoff
$\bullet O_2^-$	Superoxidanion
$\bullet OH$	Hydroxylradikal
$ONOO^-$	Peroxynitrit
PAI	Plasminogen activator inhibitor
Phox	phagozytische Oxidasen
PKC	Proteinkinase C
RAS	Renin Angiotensin System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotations per minute
RT	Raumtemperatur
sGC	lösliche Guanylzyklase
SOD	Superoxiddismutase
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
t-PA	Tissue plasminogen activator
U	Unit
VCAM	Vascular adhesion molecule
VSMC	Vascular smooth muscle cells

X	Xanthin
XO	Xanthin-Oxidase

9. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Professor Dr. Thomas Meinertz dafür, dass er mir eine Dissertation in seiner Abteilung ermöglichte.

Besonders danke ich Herrn PD Dr. Jan Kähler für Überlassung des interessanten Promotionsthemas, für die engagierte Betreuung und für seine allzeit gewährte Unterstützung, welche weit über das zu Erwartende hinausreichte.

Ebenso danke ich Natalie Obermeyer, Claudia Kuper und Hartwig Wieboldt für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft während der hervorragenden Zusammenarbeit. Gemeinsam mit Ihnen gelang es auch Rückschlägen positive Seiten abzugewinnen.

Bei meinen Eltern, Waltraud und Helmuth Knappe, möchte ich mich herzlich für ihr Verständnis, ihre Kraft und Liebe bedanken, die mich all die Jahre begleitet haben. Meinem Bruder Frank danke ich für die sorgfältige Korrektur des Manuskriptes. Er war mir eine besonders große Hilfe bei Computerfragen und technischen Problemen. Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie für die Entlastung, die ich in vielerlei Hinsicht erhielt und ohne die mir diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein großer Dank gilt meinem Freund Björn Sill. Ich danke ihm für die tatkräftige Unterstützung während der gesamten Zeit, ohne ihn hätte die Arbeit nicht in dieser Form beendet werden können.

Ich bedanke mich bei Gesine Röder und Florian Trumm für das Lesen der Arbeit und die wertvollen Anregungen und nicht zuletzt auch all diejenigen, die mir bei der Erstellung der Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen.

10. LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name Dorit Knappe
Geburtsdatum 11.07.1978
Geburtsort Hagenow

Schulbildung:

1985-1990 Thomas Müntzer Schule Kaarßen
1990-1996 Gymnasium Dömitz
06/1996 Abitur

Hochschulbildung:

04/1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
03/2000 Ärztliche Vorprüfung
2000-2003 Famulaturen: Kreiskrankenhaus Dannenberg
University of California San Diego, USA
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
University of Sydney, Australien
03/2001 1. Staatsexamen
06/2002 Beginn Promotionsstudien in der Abteilung für
Kardiologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
09/2003 2. Staatsexamen
10/2004 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr:

10/03-11/03 Allgemein Chirurgie: Kantonsspital Glarus, Schweiz
12/03-01/04 Herzchirurgie: Gachon Medical School,
Incheon/Seoul, Südkorea
02/04-03/04 Neurologie: Westmead Hospital, Sydney, Australien
04/04-05/04 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
06/04-09/04 Innere Medizin: Pulmologie/Kardiologie,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Ärztliche Tätigkeit:

04/05 Assistenzärztin, Abteilung für Kardiologie, Universitätsklinikum
Lübeck

11. ERKLÄRUNG

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

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