

Aus dem Universitären Herzzentrum
Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. Thomas Meinertz
Martinistraße 52
20246 Hamburg

Effekte einer Metoprololtherapie auf die Gefäßfunktion und
Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies bei Angiotensin II
infundierten Ratten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Alexandra von Sandersleben
aus Hamburg

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

1	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	PATHOPHYSIOLOGIE DER ENDOTHELIALEN DYSFUNKTION	1
1.2	BEDEUTUNG DES RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEMS	3
1.3	WIRKUNGSWEISE DES ANGIOTENSIN II	4
1.4	THERAPIE DER ARTERIELLEN HYPERTONIE: BEDEUTUNG DER BETABLOCKERTHERAPIE	6
1.5	WIRKUNGSWEISE DER BETABLOCKER	7
1.6	ZIEL DER STUDIE	10
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>12</u>
2.1	AUSWAHL UND BEHANDLUNG DER TIERGRUPPEN	12
2.2	ENTNAHME UND PRÄPARATION DER GEFÄSSE	12
2.3	MESSUNG DER VASKULÄREN REAKTIVITÄT IM ORGANBAD	13
2.4	BESTIMMUNG DER VASKULÄR GEBILDETEN SUPEROXIDANIONEN MITTELS LUCIGENINVERSTÄRKTER CHEMILUMINESZENZ	16
2.5	MATERIALIEN	19
2.6	DATENERFASSUNG UND –VERARBEITUNG	19
2.7	DATENANALYSE UND STATISTISCHE METHODEN	19
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>21</u>
3.1	ERGEBNISSE DER MESSUNGEN IM ORGANBAD	21
3.1.1	Effekte einer ATII-Behandlung auf die endothelunabhängige Vasodilatation	21
3.1.2	Effekte einer ATII-Behandlung auf die endothelabhängige Vasodilatation	24
3.2	ERGEBNISSE DER CHEMILUMINESZENZ-MESSUNGEN	27
3.2.1	Basale Superoxidanionenproduktion	27
3.2.2	NO-Synthase vermittelte Superoxidanionenproduktion	28

4	<u>DISKUSSION</u>	30
4.1	EINLEITUNG	30
4.2	MECHANISMEN DER ATII-BEDINGTEN ENDOTHELIALEN DYSFUNKTION	30
4.3	ANTIOXIDATIVE EIGENSCHAFTEN VON METOPROLOL	34
4.4	EFFEKTE EINER IN VIVO METOPROLOLBEHANDLUNG	37
4.5	ZUSAMMENFASSUNG UND KLINISCHE BEDEUTUNG	39
5	<u>ANHANG</u>	40
5.1	GERÄTE, MATERIALIEN, CHEMIKALIEN UND PUFFERLÖSUNGEN	40
5.1.1	Geräte	40
5.1.2	Pharmaka und Chemikalien	41
5.1.3	EDV (Hard- und Software)	42
5.1.4	sonstige Materialien	43
6	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	44
7	<u>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS</u>	47
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	49
9	<u>DANKSAGUNG</u>	57
10	<u>ERKLÄRUNG</u>	58
11	<u>LEBENS LAUF</u>	59

1 Einleitung

1.1 Endotheliale Dysfunktion

Kardiovaskuläre Erkrankungen werden in der heutigen Bevölkerung weiterhin als häufigste Todesursache angegeben. Eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Progredienz einer Vielzahl kardiovaskulärer Erkrankungen spielt die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion.

Das Endothel, das aufgrund seiner enormen Zellzahl und Oberflächenausdehnung als ein eigenständiges Organ gelten muss, reguliert über die Produktion vasodilatierender und vasokonstringierender Substanzen den Gefäßtonus. Bereits 1980 entdeckten Furchgott und Zawadzki, dass die Endothelzellen eine entscheidende Rolle bei der durch Acetylcholin (ACh) ausgelösten Gefäßrelaxation spielen (Furchgott 1980). Die für die Relaxation verantwortliche Substanz wurde zunächst als „EDRF“ (Endothelium derived relaxing factor) bezeichnet und später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987).

Endogenes NO wird im Gefäßendothel von der endothelialen NO-Synthase (eNOS, NOS III) aus der Aminosäure L-Arginin unter zwei Oxidationsschritten gebildet (Palmer et al. 1988; Pollock et al. 1991). Es existieren zwei weitere Isoformen der NO-Synthase. Die neuronale - (NOS I, nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (NOS II, iNOS), deren Aktivierung Calcium unabhängig durch verschiedene Zytokine induziert wird (Wright et al. 1992). NO führt über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) zur Bildung des second messengers cGMP (Murad 1994). Dieser wiederum aktiviert die Proteinkinase G (PKG), die eine Abnahme der zellulären Ca^{2+} -Konzentration, insbesondere durch vermehrte Aufnahme von Calcium in intrazelluläre Speicher, bewirkt, so dass das Gefäß relaxiert (Lincoln et al. 1994).

NO hat nicht nur vasodilatierende Eigenschaften, sondern inhibiert über mehrere Mechanismen den Prozess der Atherosklerose. NO reduziert zusammen mit Prostazyklin (PGI_2) die Plättchenaggregation und verhindert damit die Freisetzung von Substanzen, die stark vasokonstriktorisch wirken, wie beispielsweise Thromboxan und Serotonin (Forstermann et al. 1989; Radomski et al. 1993; Cohen et al. 1995). Weiterhin inhibiert NO die Expression von Adhäsionsmolekülen, einem wichtigen Initialschritt in der

Pathogenese der Atherosklerose und inhibiert direkt die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen am Endothel (Kubes et al. 1991; Loscalzo et al. 1995). In hohen Konzentrationen inhibiert NO die Proliferation von glatten Muskelzellen (Garg et al 1989).

Eine Schädigung des Endothels, bedingt durch Verletzungen oder kardiovaskuläre Risikofaktoren, führt über eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit zu einer gestörten NO-vermittelten Relaxation (Harrison et al. 1987). Dieser Zustand wird klinisch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet.

Dass die NO-Bildung bei einer endothelialen Dysfunktion jedoch auch normal oder sogar erhöht sein kann, wiesen Minor et al. nach (Minor et al. 1990). Ihre tierexperimentelle Studie zeigte eine durch Cholesterinfütterung erzeugte Atherosklerose mit gesteigerter Freisetzung von NO, das jedoch seine relaxierende Wirkung durch vorzeitige Inaktivierung verliert. Für diese Inaktivierung des EDRF machten Gryglewski et al. bereits 1986 freie Sauerstoffradikale verantwortlich (Gryglewski et al. 1986). Für eine Vielzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren konnte seitdem nachgewiesen werden, dass die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Oxidativer Stress) zur Initiierung und zur Progression des atherosklerotischen Prozesses beiträgt.

Unter oxidativem Stress versteht man eine Störung des physiologischen Gleichgewichts zwischen Radikalbildung und -abbau. Diese kann bedingt sein durch eine vermehrte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder Schädigung antioxidativer Schutzsysteme. Unter ROS versteht man eine Vielzahl von Verbindungen, die sich von molekularem Sauerstoff (O_2) ableiten, aber im Gegensatz zu O_2 sehr reaktionsfreudig sind. Die wesentlichen Vertreter sind Sauerstoffradikale wie das Superoxidanion (O_2^-), das Hydroxyl-Radikal (OH), sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die chemisch schnell und aggressiv wirkenden Sauerstoffradikale stören viele wichtige Funktionen und Strukturen und führen so zu verschiedenen pathologischen Veränderungen. Bei einigen kardiovaskulär bedeutsamen Veränderungen, wie der arteriellen Hypertonie (Rajagopalan et al. 1996) und der Hypercholesterinämie (Ohara et al. 1993) konnte eine gesteigerte Superoxidbildung nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich, dass NO unter diesen Bedingungen zwar ausreichend gebildet, jedoch unter Reaktion mit O_2^- inaktiviert wird. Bei dieser Reaktion entsteht das hochreaktive Stickoxid Peroxynitrit

(ONOO⁻), welches im Gegensatz zu NO die Aktivität der sGC, dem Schlüsselenzym der NO/cGMP-Kaskade, reduziert und somit zur endothelialen Dysfunktion beiträgt (Weber et al. 2001).

Bei der Untersuchung der möglichen Ursachen einer gesteigerten O_2^- -Produktion, wiesen verschiedene Studien einen starken Einfluss des Renin-Angiotensin-Systems auf die vaskuläre O_2^- -Bildung nach. Daher soll die Bedeutung und Wirkungsweise von Angiotensin II im Folgenden näher beschrieben werden.

1.2 Bedeutung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist neben dem katecholaminergen System das bedeutendste hormonelle System für die Regulation des Blutdrucks. Die Erforschung des RAAS begann 1898 mit der Untersuchung einer Substanz mit kreislaufregulatorischer Wirkung, die nach ihrem renalen Ursprung Renin genannt wurde (Tigerstedt und Bergmann 1898). 1934 konnten Goldblatt et al. den Zusammenhang zwischen renaler Ischämie und Freisetzung einer blutdruckerhöhenden Substanz nachweisen (Goldblatt et al. 1934). Braun-Menendez und Page zeigte 1958, dass durch Renin eine vasokonstriktorische Substanz aktiviert wird. Sie bezeichneten sie als Angiotensin (Braun-Menendez und Page 1958).

Heute weiß man, dass die Synthese, Speicherung und Freisetzung von Renin hauptsächlich in den glatten Gefäßmuskelzellen der afferenten Arteriole des Glomerulus (juxtaglomeruläre Zellen) erfolgt. Die Renin-Freisetzung wird durch verschiedene Mechanismen stimuliert, zum einen durch Sympathikusstimulation der juxtaglomerulären β_1 -Adrenorezeptoren, außerdem durch einen verminderten Perfusionsdruck im Vas afferens, sowie durch eine verminderte Natriumchlorid-Konzentration im distalen Tubulus. Renin selbst ist keine vasoaktive Substanz, spaltet aber als Protease aus Angiotensinogen, einem aus der Leber stammendem α_2 -Globulin, das Dekapeptid Angiotensin I ab. Aus dem biologisch nahezu inaktiven Angiotensin I (ATI) wird durch das Angiotensin-Conversions-Enzym (ACE), das vor allem in Endothelzellen vorkommt, das Oktapeptid Angiotensin II (ATII) abgespalten. ATII wiederum bindet an Rezeptoren, die an der Oberfläche von Zielzellen lokalisiert sind

(AT₁/AT₂-Rezeptoren). Nahezu alle Eigenschaften des ATII sind durch den AT₁-Rezeptorsubtyp vermittelt (siehe Abb. 1).

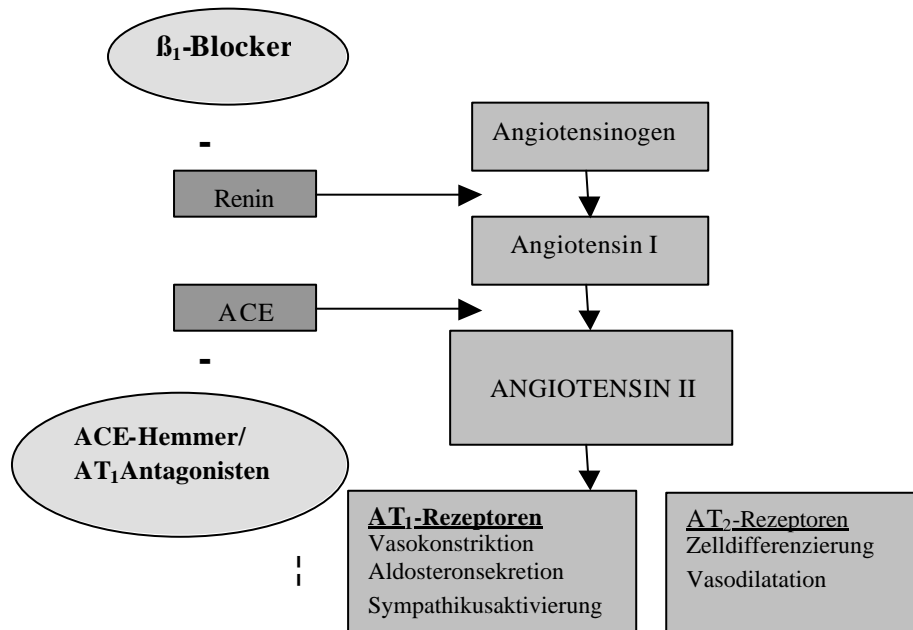


Abbildung 1: Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems mit Wirkungsprofil der AT₁/AT₂-Rezeptoren und unterschiedlichen blockierenden Substanzgruppen

1.3 Wirkungsweise des Angiotensin II

Die Aktivierung des RAAS führt zur Bildung von ATII, das direkt vasokonstriktorisch wirkt, die Aktivität der sympathischen Synapse erhöht und am Herzen zu einer positiven Inotropie führt. Die vasokonstriktorische Wirkung von ATII am Gefäßmuskel wird über AT₁-Rezeptoren vermittelt. Der AT₁-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der die Aktivierung der Phospholipase C bewirkt. Diese induziert über die Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in der glatten Muskelzelle, sowie die Aktivierung der Proteinkinase C. Letztere vermittelt die Expression von Proto-Onkogenen, die die proliferative Wirkung von ATII erklären. Weiterhin ist ATII an der zentralnervösen Regulation des Sympathikus und des Blutdrucks und über die Stimulation der Aldosteronsynthese und -sekretion in der Nebennierenrinde, sowie über die Natriumrückresorption in den Nierentubuli an der Volumen- und Elektrolythomöostase beteiligt.

Darüber hinaus spielt ATII eine Schlüsselrolle bei der Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Für den ATII bedingten Sauerstoffradikalanstieg ist nicht der Hypertonus per se verantwortlich, was Studien der Arbeitsgruppen um Rajagopalan und Laursen bewiesen (Rajagopalan et al. 1996, Laursen et al. 1997). Beide Studien zeigten, dass ein Noradrenalin induzierter Hypertonus im Gegensatz zur ATII-Behandlung keine Sauerstoffradikalerhöhung verursacht.

Hauptverantwortlich für die $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung in vaskulärem Gewebe sind Enzyme, die sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Gefäßmuskelzellen Sauerstoffradikale produzieren. Zu diesen Enzymen zählen die NADPH-abhängigen Oxidasen (Griendling et al. 1994, Mohazzab et al. 1994, Pagano et al. 1995). Die Aktivität dieser Oxidase lässt sich *in vitro* durch ATII stimulieren (Griendling et al. 1994). Rajagopalan et al. wiesen *in vivo* ebenso einen durch ATII-Infusion bedingten Superoxidanstieg über die Aktivierung von NADH/NADPH-Oxidasen nach (Rajagopalan 1996). Die gebildeten Sauerstoffradikale reagieren unter anderem mit endothelial gebildetem Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit (ONOO^-) und führen so zur NO-Inaktivierung (Beckman et al. 1996).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der zur zusätzlichen Bildung von Sauerstoffradikalen durch ATII beiträgt, ist die sogenannte „eNOS-Entkopplung“. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer früheren *in vivo* Studie nachweisen, dass eine AT II-Behandlung die Aktivität und Expression der NADPH-Oxidase steigert und darüber zu hohem oxidativem Stress in den Gefäßen führt. Daneben ist unter den Bedingungen des oxidativen Stresses auch die Expression der eNOS erhöht. Diese zeigt aber eine sogenannte Entkopplungsreaktion, das heißt ein Enzym, das antiatherosklerotisch über eine NO Bildung wirkt, wird umgeschaltet auf ein Enzym, das Superoxidanionen bildet und damit den Prozess der Atherosklerose stimuliert (Hink et al 2001). Unter tierexperimentellen Bedingungen zeigte sich, dass die Entkopplung der NOS durch Proteinkinase C (PKC) vermittelt wird (Mollnau et al. 2002).

Da sowohl die arterielle Hypertonie als auch die koronare Herzerkrankung mit einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems assoziiert sind, war die Erkenntnis, dass ATII über die Bildung von Sauerstoffradikalen und damit über eine reduzierte Bioaktivität von NO zu endothelialer Dysfunktion führt (Rajagopalan 1996, Laursen 1997), um so wichtiger. Das Ergebnis einer Studie von Alderman, in der eine mit

erhöhten Reninspiegeln assoziierte Hypertonie mit einem erhöhten Myokardinfarkttrisiko einhergeht (Alderman et al. 1991) wurde damit bekräftigt.

1.4 Therapie der arteriellen Hypertonie: Bedeutung der Betablockertherapie

Betarezeptorenblocker sind eine ältere Substanzklasse, die bereits seit Jahrzehnten eine weite Verbreitung als Antihypertensiva und Antiarrhythmika finden.

Ebenso sind die Betablocker seit langem in der Therapie der koronaren Herzerkrankung etabliert. So zeigten verschiedene Studien, dass sie die Schwere und Häufigkeit vor allem von belastungsinduzierten Angina pectoris-Anfällen mindern und die Sterblichkeit beim akuten Myokardinfarkt senken (Hjalmarson et al. 1981, Gottlieb et al. 1998).

Eine neuere Indikation für Betablocker besteht in der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz. Bereits in den 70er Jahren publizierte eine schwedische Arbeitsgruppe (Waagstein et al. 1975) die günstigen Effekte einer Langzeittherapie mit Betablockern bei sieben Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. Trotz der positiven Ergebnisse konnte sich in den darauffolgenden Jahren die Herzinsuffizienztherapie mit Betablockern aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkungen durch negativ inotrope und chronotrope Effekte zunächst nicht durchsetzen. Erst nachdem seit Anfang der 90er Jahre große randomisierte Studien den Einfluss verschiedener Betablocker auf die Prognose der Herzinsuffizienz untersuchten (CIBIS 1994, Packer et al. 1996, MERIT-HF 1999), wurde der Stellenwert einiger Betablocker für die Therapie der Herzinsuffizienz eindeutig belegt. Diese Studien wiesen für die Betablocker Bisoprolol, Carvedilol und Metoprolol bei der Behandlung der Herzinsuffizienz (NYHA II-III) additiv zur Standardtherapie mit ACE-Hemmern, Digitalis und Diuretika eine Letalitätssenkung nach. Hierbei sprach eine vergleichende Multicenterstudie Carvedilol ein verbessertes *Outcome* gegenüber Metoprolol zu (Poole-Wilson et al. 2003). Für Carvedilol sind sogar bei schwerster Herzinsuffizienz (NYHA IV) günstige Wirkungen belegt (COPERNICUS 2001).

1.5 Wirkungsweise der Betablocker

Betablocker unterscheiden sich in ihren receptorspezifischen Eigenschaften. Es werden drei unterschiedliche β -Rezeptortypen differenziert, von denen hier zwei erläutert werden:

- β_1 -Rezeptoren finden sich hauptsächlich im Herzmuskel. Eine medikamentöse Blockade dieser Rezeptoren bewirkt eine negative Inotropie, Chronotropie und Dromotropie.
- β_2 -Rezeptoren finden sich im Herzmuskel, in den Bronchien und in den peripheren glatten Muskeln. Die Blockierung dieser Rezeptoren führt zu Vaso- und Bronchokonstriktion.

Neben den β_1 - und β_2 -Rezeptoren haben die β_3 -Rezeptoren wichtige Funktionen im Fettgewebe und Gastrointestinaltrakt. Ihre Aktivierung führt u.a. zur Lipolyse.

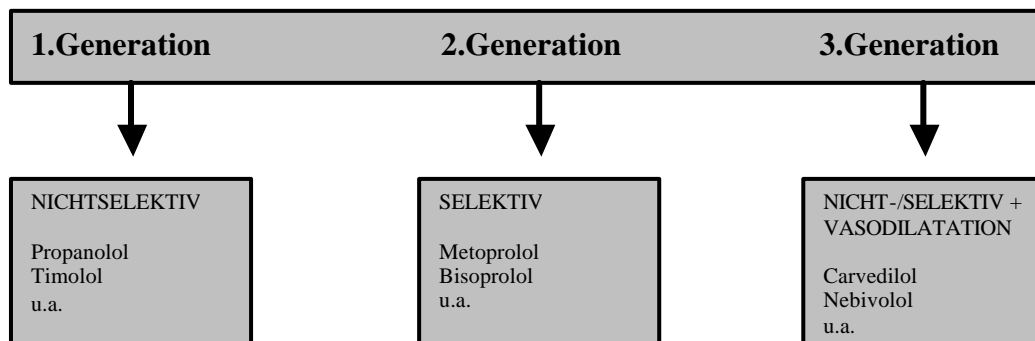


Abbildung 2: Klassifikation der Betablocker (modifiziert nach Bristow 2000)

Bristow nahm eine Klassifikation der Betablocker in drei Gruppen nach ihrer β_1 / β_2 -Selektivität bzw. Kardioselektivität (β_1 -Rezeptoren) und zusätzlicher Blockade α_1 -Rezeptoren vor (siehe Abb. 2). Propranolol ist dabei der Prototyp nicht-selektiver Betablocker und wurde 1968 als antianginöses Medikament eingeführt. In den 70er und 80er Jahren folgte die Entwicklung kardioselektiver Betablocker, wie Metoprolol und Bisoprolol. Einen zusätzlichen positiven Effekt bei der Hochdrucktherapie zeigten die Betablocker der dritten Generation, wie Carvedilol und Nebivolol, die neben β_1 (und β_2)-

Blockade über einen zusätzlichen vasodilatierenden Effekt verfügen. Dieser beruht beim Carvedilol auf einer zusätzlichen Blockade der α_1 -Rezeptoren. Beim Nebivolol beruht dieser Effekt auf einer Bindung an die erst kürzlich auch in Endothelzellen nachgewiesenen β_3 -Rezeptoren. Nebivolol aktiviert über die β_3 -Rezeptoren die eNOS und stimuliert nachfolgend die NO Bildung (Dessy et al. 2005).

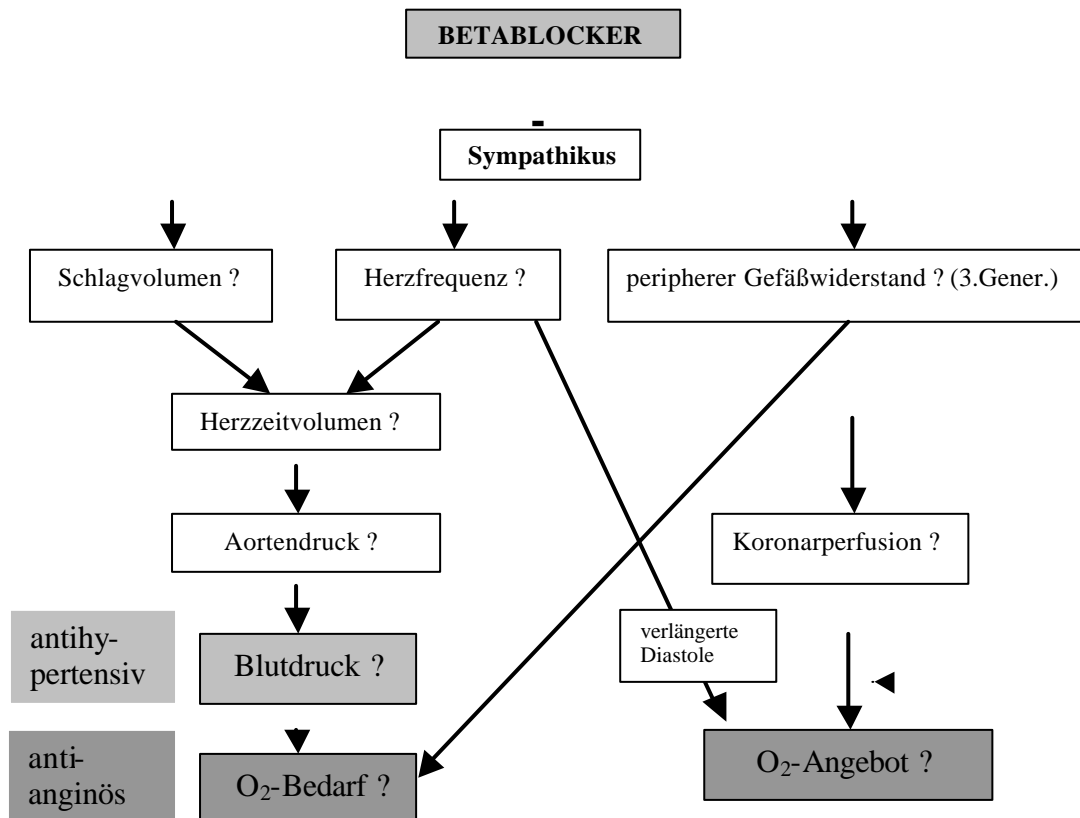


Abbildung 3: Hämodynamische Effekte der Betablocker

Ziel der antiischämischen Therapie bei der koronaren Herzerkrankung ist es, das Gleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und –bedarf günstig zu beeinflussen. Ansatzpunkt für die Betablocker ist dabei, den kardialen Sauerstoffbedarf zu reduzieren, indem sie die Kontraktilität mindern und die Herzfrequenz senken (siehe Abb. 3).

Bei der Herzinsuffizienz hat sich die antiadrenerge Therapie mit Betablockern additiv zu der Basistherapie mit Digitalis, Diuretika und ACE-Hemmer zu einer etablierten Behandlungsform entwickelt.

Ursprünglich wurde angenommen, dass der günstige Effekt der Betablockertherapie durch Einsparung von Energie aufgrund der Hemmung myokardialer Effekte einer chronischen Sympathikus-Aktivierung erzielt wird (Waagstein et al. 1975, Bristow 1993). Im Laufe der Zeit wurden jedoch zusätzliche Mechanismen diskutiert, die alle einen günstigen Effekt auf die pathophysiologischen Veränderungen durch übermäßige sympathoadrenerge Aktivierung der chronischen Herzinsuffizienz haben. Hierzu gehört die Hochregulation der β -Rezeptoren, die zuvor durch erhöhte endogene Katecholaminspiegel zur Kompensation der Herzinsuffizienz abgenommen haben (Lefkowitz 1984). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Betablocker eine Abnahme inhibitorischer G-Proteine bewirken (Sigmund 1996). Diese halten die kardiale Adenylatzyklase auf einem niedrigen Niveau und führen so zu einer Desensibilisierung des β -adrenergen Systems. Die Abnahme der erhöhten G_i -Proteine ist für die Wiederansprechbarkeit auf endogene Katecholamine von Bedeutung (siehe Abb. 3).

Eine weitere pathogenetische Veränderung der sympathoadrenergen Überstimulation ist die durch O_2 -Mangelzustände bedingte Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Diese reaktiven Sauerstoffverbindungen führen wie bereits beschrieben über eine Inaktivierung des vasodilatierenden Stickstoffmonoxids (NO) zur Schädigung der Kontraktilität und Dilatationsfähigkeit und somit zur endothelialen Dysfunktion.

In jüngerer Zeit wurde untersucht, inwieweit Betablocker zur Protektion gegen freie Radikale bzw. oxidativen Stress beitragen können und somit als nichtenzymatische Radikalabfänger („Scavenger“) dienen.

Für Carvedilol, einen Betablocker der dritten Generation, wurden die antioxidative Wirkung und damit die Verbesserung der endothelabhängigen Dilatationsfähigkeit bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen (Yue et al. 1992, Lopez et al. 1995, Lysko et al. 2000). Hierbei machten Yue et al. die Hydroxylgruppe am Carbazolring für die radikalabfangenden Effekte verantwortlich. Ebenso konnte durch unsere Arbeitsgruppe in einer früheren Studie für einen weiteren Betablocker der dritten Generation, Nebivolol, ein antioxidativer Effekt nachgewiesen werden (Mollnau et al. 2003).

Metoprolol ist ein schon seit langem bewährtes Standardpräparat mit sehr weiter Verbreitung. Es verbessert die Symptomatik und Prognose bei den klassischen Indikationen, wie des arteriellen Hypertonus (Wikstrand et al. 1988, WHO-Hypertension-Guidelines 1999) und der koronaren Herzerkrankung (Hjalmarson et al 1991). Zudem ist es indiziert bei der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (MERIT-HF 1999). Die Mechanismen, die zum kardioprotektiven Effekt bei der Herzinsuffizienz beitragen, sind nur zum Teil bekannt. Verschiedene *in vitro*-Studien untersuchten bereits Metoprolol auf seine adrenorezeptor-unabhängigen Eigenschaften. Marton et al. (Marton 2001) konnten für einige Betablocker, unter anderem für Metoprolol, einen im Verhältnis zu anderen Substanzen schwachen, aber signifikanten antioxidativen Effekt nachweisen. In ihrer *in vitro*-Studie wurden zunächst mittels Phenazin-Methosulfat freie Radikale in roten Blutkörperchen generiert, diese dann mit verschiedenen kardiovaskulären Substanzen inkubiert und so deren Potential als Radikalabfänger untersucht.

Dunzendorfer et al. (Dunzendorfer 2000) wiesen ebenso in einer *in vitro*-Studie für Metoprolol einen antioxidativen und PKC-Inhibitor-ähnlichen Effekt nach. Sie untersuchten die inhibitorische Fähigkeit des Betablockers Metoprolol auf eine durch zwei Substanzen (fMLP = N-Formyl-Met-Leu-Phe und PMA = Phorbol Myristate Azetat) provozierte intra- und extrazelluläre $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion in humanen neutrophilen Granulozyten. Metoprolol führte sowohl bei fMLP als auch bei PMA zu einer Inhibition der provozierten Reaktion. Wie zusätzliche Versuche mit dem Beta-Rezeptor-Agonisten Orciprenalin zeigten, war dieser Effekt nicht adrenorezeptor-vermittelt.

1.6 Ziel dieser Studie

In der vorliegenden Arbeit sollen die Effekte einer *in vivo*-Behandlung mit dem Betablocker Metoprolol bei ATII-induzierten hypertensiven Ratten auf die Sensitivität von Aortensegmenten gegenüber endothelabhängigen und endothelunabhängigen Vasodilatoren untersucht werden. Es soll weiterhin ermittelt werden, ob Metoprolol zu einer Verminderung des Angiotensin II-induzierten oxidativen Stress führt. Darüber hinaus soll geklärt werden, inwieweit eine NOS-Entkopplung verhindert werden kann. Eine Zusammenfassung der durch diese Studie zu klärenden Fragestellungen ist in Abbildung 4 aufgeführt.

Einfluss einer *in vivo*-Behandlung mit Metoprolol bei ATII induziertem Hypertonus auf:

- die vaskuläre Reaktivität auf endothelabhängige/endothelunabhängige Vasodilatoren
- die vaskuläre $\cdot\text{O}_2^-$ Produktion
- die NOS-Entkopplung

Abbildung 4: Zusammenfassung der Ziele dieser Studie

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl und Behandlung der Tiergruppen

Die Untersuchungen wurden mit männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Das Körpergewicht der Versuchstiere betrug zwischen 210-250g. Nach dem Zufallsprinzip wurden die Versuchstiere einer der nachfolgenden Gruppen zugeteilt:

- KTR: Eine Kontrollgruppe, die über subkutan implantierte osmotische Minipumpen (Fa. Alza Corp) isotone Kochsalzlösung (NaCl) als Placebo erhielt. Diese Gruppe wurde ansonsten unter gleichen Bedingungen und für einen ebenso langen Zeitraum wie die medikamentös behandelten Tiere gehalten.
- ATII: Eine Gruppe, die ebenso über osmotische Minipumpen mit Angiotensin II (1mg/kg/d) über einen Zeitraum von sieben Tagen behandelt wurde.
- KTR + METO: Diese Behandlungsgruppe erhielt über eine zusätzliche subkutane Minipumpe den Betablocker Metoprolol mit einer Dosierung von 100mg/kg/d.
- ATII + METO: Eine mit Angiotensin II behandelte Gruppe, die ebenso Metoprolol mit gleicher Dosierung erhielt.

Die Studie wurde durchgeführt in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierexperimente des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

2.2 Entnahme und Präparation der Gefäße

Um Störfaktoren weitestgehend auszuschließen, wurde der im Folgenden beschriebene Ablauf für alle vier Versuchsgruppen streng eingehalten.

Am Morgen des Untersuchungstages, sieben Tage nach Beginn der Angiotensin II / Metoprolol-Behandlung, wurde den Versuchstieren zur Verhinderung der postmortalen

Blutkoagulation 1000 I.E. Heparin intravenös injiziert. Anschließend wurden die Tiere mit einer Überdosis Eunarcon ® (Pentobarbital) eingeschläfert.

Unmittelbar postmortal wurde der Brustkorb zügig eröffnet, die thorakale Aorta präpariert und unter Vermeidung von Zug- und Druckkräften, die mit einer Verletzung des Endothels einhergehen könnten, entnommen. Die Aorta wurde dann in mit Krebs-HEPES-Puffer (KH-Puffer, Zusammensetzung [mM]: NaCl 118,3; KCl 4,69; CaCl₂ 1,87; MgSO₄ 1,20; K₂HPO₄ 1,03; NaHCO₃ 25,0; HEPES 20,0 und Glucose 11,1; pH 7,4) gefüllten Probengefäßen auf Eis gelagert.

Bei der weiteren Präparation im Labor wurden die Gefäße in derselben Pufferlösung unter Schonung des Endothels mit einer feinen Pinzette und einer Federschere von überschüssigem adventitialen Bindegewebe befreit. Dabei durften sich die Gefäßinnenwände nicht berühren, sowie auch sonstige mechanische und thermische Einflüsse vermieden werden. Die bei der Resektion gequetschten Enden der Aorta wurden vorsichtig mit einem Skalpell abgetrennt. Anschließend wurde die von Adventitia befreite Aorta mit einem Skalpell in ca. 5 mm lange Ringsegmente geschnitten und bis zur eigentlichen Messung bzw. Inkubation auf Eis gehalten.

2.3 Messungen der vaskulären Reaktivität im Organbad

Die Organbadanlage stellt ein etabliertes Verfahren zur Messung von Relaxation und Kontraktion von Gefäßringen auf physiologische wie pharmakologische Stimuli dar (Münzel et al, 1995). In dieser Studie wurden die relaxierenden Effekte auf Gaben von Nitroglycerin (NTG) und dem endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin (ACh) gemessen.

In acht Organbädern, d.h. mit 25ml Phosphat-Puffer gefüllten Behältern, wurden die Aortenringe mit vasoaktiven Substanzen, die in steigenden Konzentration zugegeben wurden, inkubiert. Die daraus resultierende Tonusänderung wurde durch folgende Messanlage (siehe Abb. 6) registriert.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch das Messprinzip der isometrischen Organbaduntersuchung.

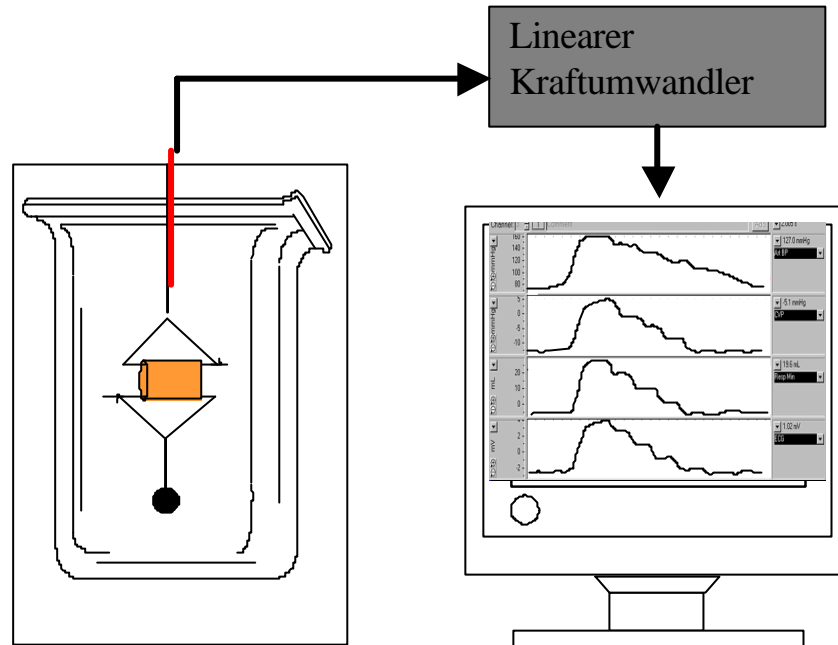


Abbildung 5: Schematisch dargestelltes Messprinzip der isometrischen Organbaduntersuchung
Der Aortenring ist auf der einen Seite fixiert und auf der anderen Seite mit einem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden. Dieser registriert die Tonusänderungen und leitet diese zum aufzeichnenden Computer weiter.

Die acht Organbäder waren jeweils mit 25ml Pufferlösung folgender Zusammensetzung gefüllt [mM]: NaCl 118,3; KCl 4,69; CaCl_2 1,87; MgSO_4 1,20; K_2HPO_4 1,03; NaHCO_3 25,0 und Glucose 11,1. Ein pH-Wert von 7,35 wurde durch vorsichtige Titration von HCl 10M beziehungsweise NaOH 10M eingestellt. Zusätzlich wurde zur Unterdrückung der Prostaglandinsynthese jeweils 10 μM Indometacin in die Organbäder gegeben.

Die Pufferlösung wurde konstant auf 37,0° C beheizt und mit einem Carbogen-Gasgemisch (95% O_2 und 5% CO_2) umspült. Zwischen den jeweiligen Untersuchungen wurden die zugegebenen Substanzen und die Pufferlösung über ein zu- und abführendes Pumpsystem zweimal ausgewaschen.

Je ein Gefäßring pro Behälter wurde über zwei feine, nicht rostende Drähte an der einen Seite fixiert und an der anderen Seite mit einem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden. Die pharmakainduzierten Tonusänderungen der glatten Gefäßmuskulatur wurden über den Kraftaufnehmer registriert und durch digitale Umwandlung auf dem Computerbildschirm (Apple Macintosh, Power PC, Mac-Lab Programm) graphisch dargestellt.

Vor Beginn der Messungen erfolgte über eine Stunde die schrittweise, passive Vordehnung der Aortenringe bis zu einer Endspannung von fünf Gramm. Vorausgegangene Experimente hatten diese als physiologisch optimale Spannung ermittelt, bei welcher die maximale vasokonstriktorische Antwort auf KCl erfolgte. Die Gefäßringe wurden anschließend so oft mit 80 mM KCl konstringiert bis eine konstante isometrische Kontraktion registriert werden konnte. Es folgte eine KCl-Dosiswirkungskurve mit ansteigenden KCl-Konzentrationen von 5-80mM. Nach dieser KCl induzierten maximal möglichen Kontraktion des Gefäßes, die für den weiteren Versuchsablauf als hundertprozentige Kontraktion angesehen wurde, wurde mit frischer Pufferlösung gewaschen und gewartet bis der Ausgangstonus von fünf Gramm wieder erreicht war.

Im weiteren Verlauf erfolgte zunächst die Untersuchung der endothelabhängigen Vasodilatation mittels Acetylcholin nach Vortonisierung mit Phenylephrin auf 40-50% des KCl-Maximaltonus. Ausgehend von dieser Vortonisierung wurde Acetylcholin (ACh) kumulativ in halblogarithmischen Schritten (10^{-9} bis zur maximalen Konzentration von $10^{-5,5}$ M) hinzugegeben und das Ausmaß der Vasodilatation registriert.

Anschließend erfolgte nach zweimaligem Waschen und erneuter Vortonisierung die Messung der endothelunabhängigen Relaxation mittels Nitroglycerin-Dosiswirkungskurve (10^{-9} bis $10^{-5,5}$ M).

Der Grad der Relaxation wurde für jede Konzentrationsstufe relativ zur maximalen Phenylephrin-Antwort als Prozentwert ausgedrückt. Als 100%ige Relaxation wurde diejenige angesehen, die in der Lage war, die Spannung des Gefäßrings auf den Wert zu mindern, den er vor der Vorkonstriktion mit Phenylephrin hatte. Die halbmaximale Wirkdosis (ED_{50}) entsprach der effektiven Dosis zum Erreichen einer halbmaximalen Relaxation.

2.4 Bestimmung der vaskulär gebildeten Superoxidanionen mittels Lucigeninverstärkter Chemilumineszenz

Zur Detektion der vaskulär gebildeten Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2^-$) wurde die Lucigenin verstärkte Chemilumineszenz (LICL) verwendet. Dabei reduzieren $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale das Lucigenin und bilden ein Dioxethan-Zwischenprodukt, bei dessen Zerfall Lichtblitze emittiert werden. Dieser von Gyllenhammar et al. 1987 methodisch aufgearbeitete Assay (Gyllenhammar 1987) hat bereits vielfach Verwendung gefunden. Dabei hat sich gezeigt, dass Lucigenin spezifisch für die Bestimmung von $\cdot\text{O}_2^-$ verwendet werden kann, da andere Radikale wie $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 , $\cdot\text{ONOO}^-$ kein Chemilumineszenz (CL)-Signal erzeugen konnten (Gyllenhammar 1987). Da Lucigenin in hohen Konzentrationen ($250\mu\text{M}$) selbst $\cdot\text{O}_2^-$ generiert, wurde das Assay von unserer Arbeitsgruppe modifiziert, indem die Konzentration des Lucigenin reduziert wurde ($5\mu\text{mol}$) (Skatchkov 1999).

Die bei der Reaktion von Superoxidanionen und dem Lucigenin entstehenden Lichtquanten ($h\nu$) wurden durch den Chemilumineszenz-Counter Beckmann LS-1801 registriert und quantitativ als „Impulse pro Minute“ (IPM) dargestellt. Über einen angeschlossenen Drucker wurden die IPM dann aufgezeichnet (siehe Abb. 7).

Die folgende Abbildung zeigt schematisch das Messprinzip der Superoxiddetektion.

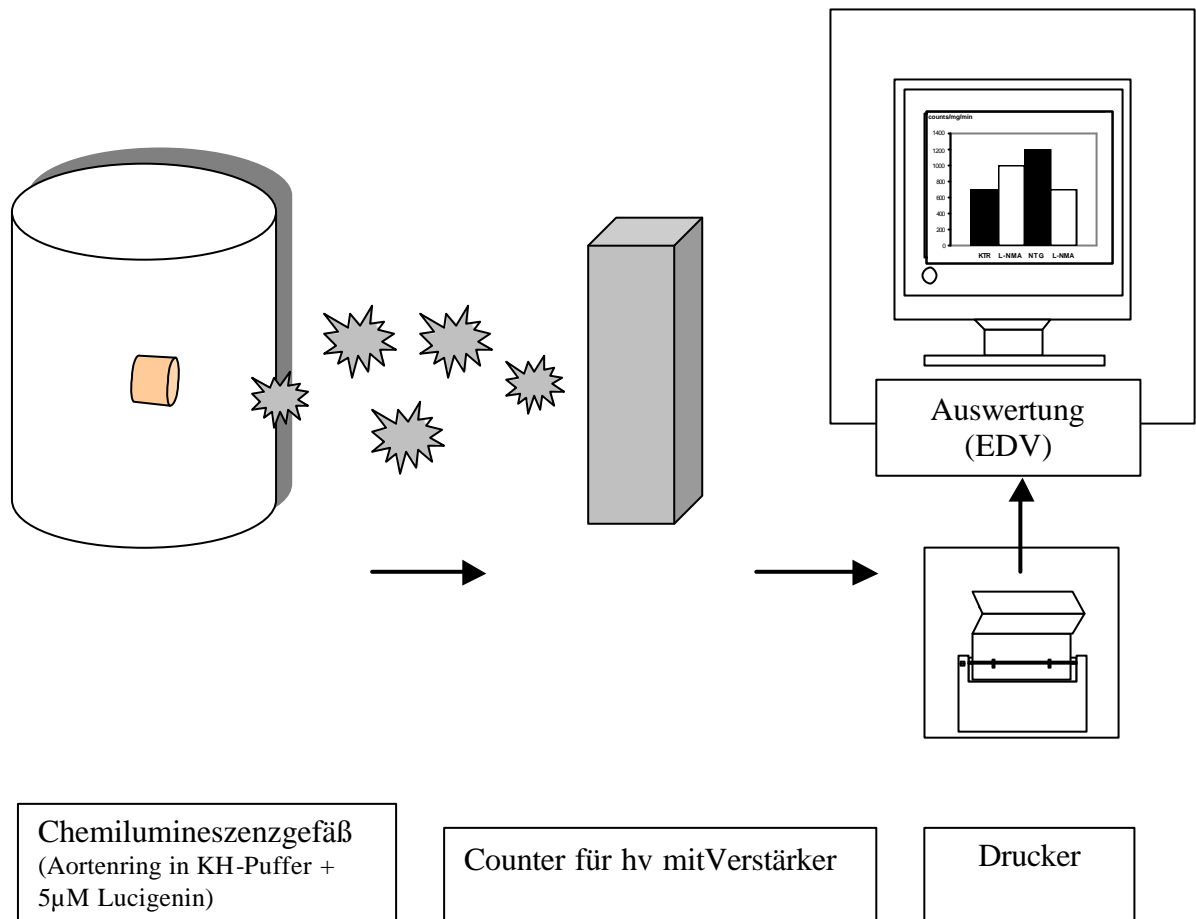


Abbildung 6: Schematisch dargestelltes Messprinzip der Superoxiddetektion

Der Aortenring schwimmt in dem mit der Verstärkersubstanz Lucigenin angereicherten Krebs-Hepes Puffer (KH-Puffer). Die gebildeten Superoxidanionen reagieren mit dem Lucigeninkation unter Emission von Lichtquanten (hv) die von einem Detektor registriert und verstärkt werden. Die IPM werden über einen angeschlossenen Drucker aufgezeichnet und dann per EDV weiterverarbeitet.

Um mögliche Störeinflüsse in Form von Temperaturschwankungen während der Messung auszuschließen, wurde der Beckmann-Counter mit einer Kühlapparatur der Firma Beckmann konstant temperiert.

Die Gefäßringe ohne Endothel (E-) wurden bis zum Versuchsbeginn ebenso wie die Gefäße mit Endothel (E+) auf Eis gehalten. Vor der eigentlichen Radikalmessung

konnten die Aortenringe für 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad (Fissons HS 89100) equilibrieren.

Zwischenzeitlich wurden die Glasszintillationsgefäße (Szintillations-Probengefäße „Econo Glass Vials“, Fa. Packard) vorbereitet, d.h. mit 700µl Krebs-HEPES-Puffer (KH-Puffer) und Lucigenin (bis-N-methylacridium; Sigma) in einer Konzentration von 5µM befüllt. Der pH Wert der KH-Lösung wurde mit HCl 10M beziehungsweise mit NaOH 10M auf 7,4 eingestellt. Vor jeder Messung musste nun eine Dunkeladaptation und Leerwertmessung der Probengefäße erfolgen, da eine zuvor erfolgte starke Lichteinwirkung ein zu hoch gemessenes CL-Signal bewirkt hätte. Nach 15minütiger Dunkeladaptation der Probengefäße wurde eines davon in die Messapparatur des Chemilumineszenzcounters eingebracht. Anschließend wurde für sechs Minuten im „out-of-coincidence“-Modus ein Leerwert bzw. Hintergrund, d.h. die allein durch Lucigenin produzierte Chemilumineszenz, gemessen. Stellte sich ein Plateau ein, wurde der letzte Wert der Messung als Leerwert benutzt und am Ende jeder Messung von den Messwerten abgezogen. Erst nach dieser Hintergrund-Bestimmung, die immer in einem bestimmten Bereich lag und die gleiche Kinetik aufwies, wurde die eigentliche Probenmessung durchgeführt.

In das vorbereitete Glasszintillationsgefäß wurde daraufhin ein im Wasserbad inkubierter Aortenring überführt, und das CL-Signal über 15 Minuten jede Minute einmal gemessen. Um die Messdaten als Counts pro Milligramm je Zeiteinheit (Counts/mg/min) ausdrücken zu können, wurden die Gefäßringe anschließend für 24 Stunden in einem 90 Grad Celsius warmen Trockenschrank aufbewahrt und nach der Trocknungszeit mit einer Präzisionswaage (Mettler H51; Kleinstwert der Fehlergrenze 0,05 mg) gewogen.

Zusätzlich wurden zur Abschätzung der durch die endotheliale NO Synthase vermittelten Superoxidproduktion einzelne Gefäßsegmente für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius mit dem NOS-Hemmstoff N^G-Nitro-L-Arginin (LNNA; Sigma; 1 mM) inkubiert (Skatchkov et al. 1999, Münzel et al. 2000). Anschließend wurde ebenso mittels Chemilumineszenz die Superoxidproduktion gemessen.

2.5 Materialien

s. Anhang

2.6 Datenerfassung und -verarbeitung

Das Signal des linearen Kraftumwandlers bei den Experimenten in der Organbadanlage ist durch einen Analog/Digital-Wandler (MacLab 8/e) digitalisiert, und über die MacLab Software (Macintosh) zur Darstellung gebracht worden. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 5.0 erfasst und mittels Tabellenkalkulation weiterverarbeitet. Die Präsentation der Daten in Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) wurde mit den Programmen Cricket Graph und MS Power Point umgesetzt. Zur Textverarbeitung wurde das Programm MS Word verwendet.

Die Messdaten im Chemilumineszenz-Zähler wurden über einen Matrixdrucker ausgedruckt und anschließend mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 5.0 (Microsoft) weiterverarbeitet. Dabei wurde das Hintergrundsignal (Glasszintillationsgefäß alleine, Nullwert) von den einzelnen Messwerten subtrahiert, um so die Anzahl der (Netto-) Impulse pro Minute erhalten. Die Fläche unter der Kurve wurde rechnerisch durch Integration (NIH-Image) bestimmt. Die graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen Cricket Graph und MS Power Point als Säulendiagramm.

Für die benutzten Programme besitzt die kardiologische Arbeitsgruppe die notwendige Lizenz. Als Hardware wurden Power PC der Firma Apple benutzt.

2.7 Datenanalyse und statistische Methoden

Von allen Messwerten wurden zunächst der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet sowie die Anzahl der Versuche bestimmt. Daraus wurde der Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean = SEM) abgeleitet (= Standardabweichung / Wurzel n [n=Stichprobengröße]) und nachfolgend alle Ergebnisse als arithmetischer Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die ED₅₀-Werte der Organbaduntersuchungen wurden

durch logarithmische Transformation berechnet. Die Unterscheidungen der Behandlungsgruppen (ED₅₀-Werte, maximale prozentuale Relaxation und Konstriktion sowie Superoxidanionen-Produktion) wurden mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Test evaluiert.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% wurde als signifikant bezeichnet ($p < 0,05$). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket SPSS (Version 11.5.1, SPSS Inc., USA).

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Messungen im Organbad

3.1.1 Effekte einer ATII-Behandlung auf die endothelunabhängige Vasodilatation

Zur Bestimmung der endothelunabhängigen Relaxation wurde eine Dosis-Wirkungskurve nach Einbringen von Nitroglycerin (NTG) in Konzentrationen von 10^{-9} bis $10^{-4,5}$ M in das Organbad erstellt.

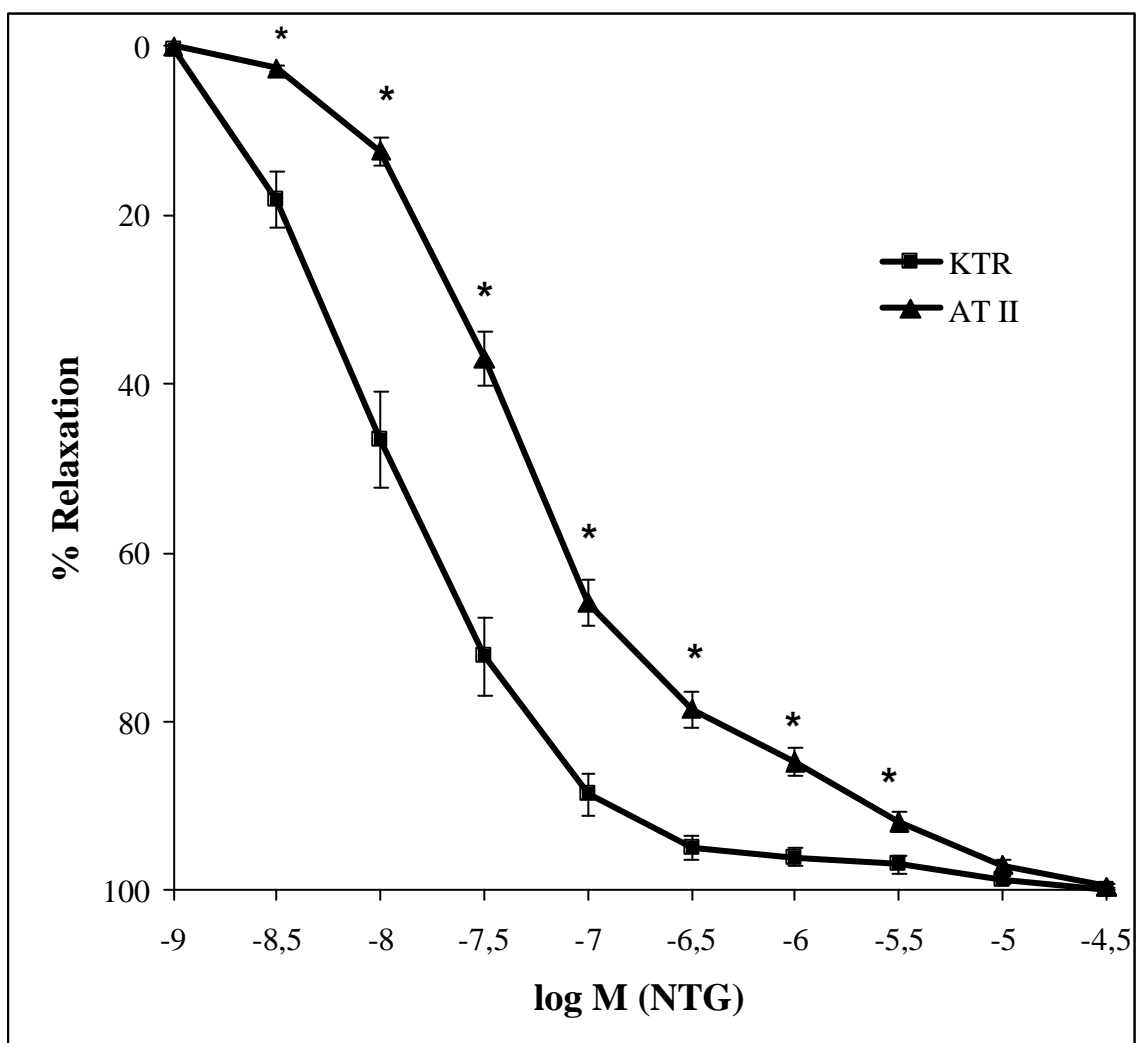


Abbildung 7: Dosis-Wirkungs-Kurve der Vasodilatation durch Nitroglycerin (NTG) nach Vorkonstriktion durch Phenylephrin in aortalen Segmenten der Kontrollgruppe (KTR, geschlossene Quadrate, n= 13) und der mit Angiotensin II behandelten Tiere (ATII, geschlossene Dreiecke, n=27). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte mit Standardfehler; (* = $p < 0,05$ vs. KTR für die Konzentrationen $10^{-8,5}$ bis $10^{-5,5}$ M)

Wie in Abbildung 7 dargestellt führte Nitroglycerin bei den Versuchen mit Aortensegmenten von Kontrolltieren (KTR) zu einer dosisabhängigen Maximalrelaxation von $99,96 \pm 0,04$ % mit einer ED_{50} von $7,91 \pm 0,09$ [-log M]. Die siebentägige *in vivo* Vorbehandlung mit Angiotensin II (ATII) führte zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve, d.h. einer Abschwächung des vasodilatatorischen NTG-Effektes, mit noch einer maximalen Relaxation von $99,51 \pm 0,22$ %. Die Sensitivität gegenüber NTG (ED_{50} : $7,28 \pm 0,05$ [-log M]) war in dieser Gruppe im Vergleich zu Kontrolltieren aber signifikant reduziert ($p < 0,05$).

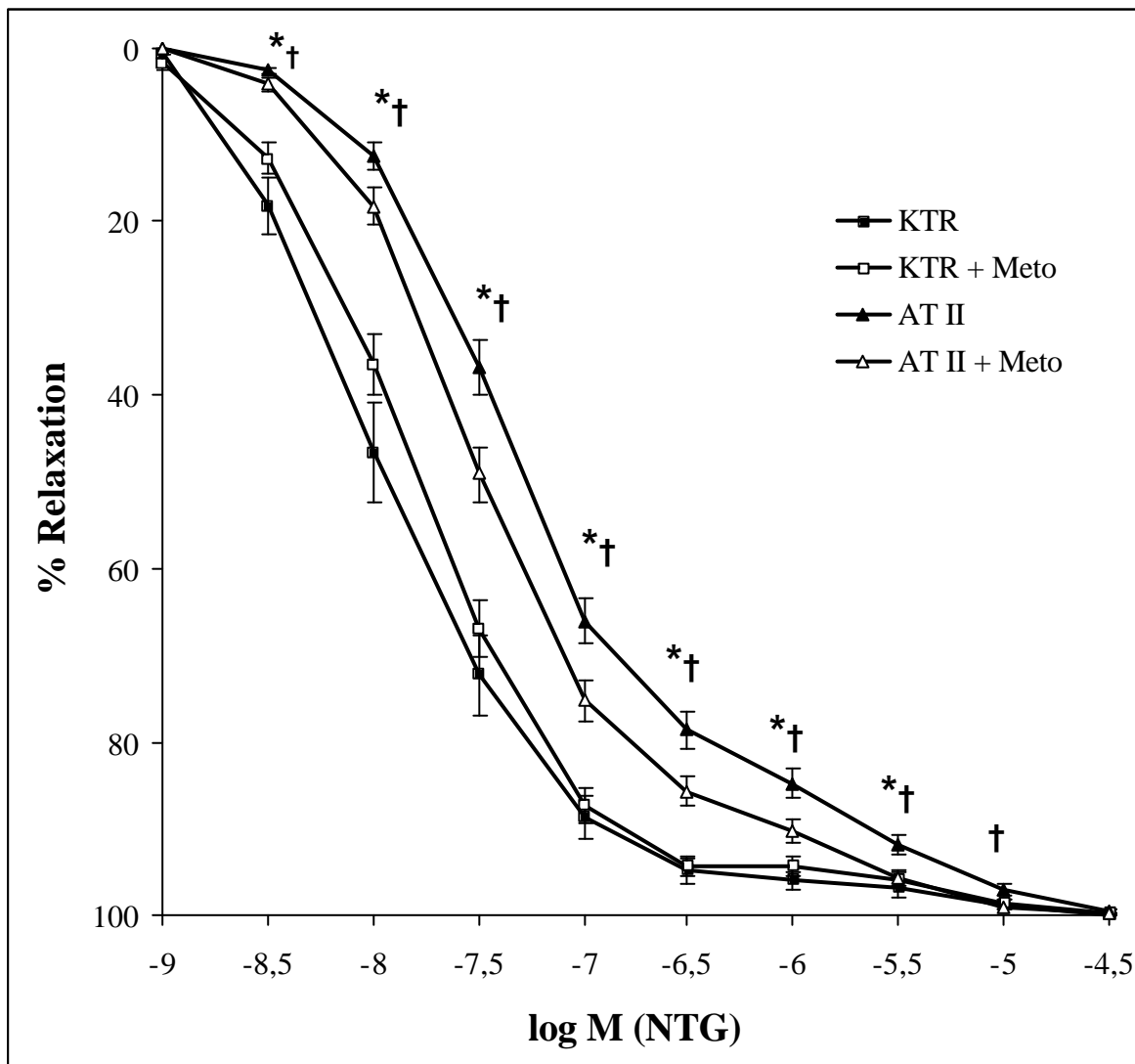


Abbildung 8: Dosis-Wirkungs-Kurve der Vasodilatation durch Nitroglycerin (NTG) nach Vorkonstriktion durch Phenylephrin in aortalen Segmenten der Kontrollgruppe (KTR, geschlossene Quadrate, n= 13) und der mit Angiotensin II behandelten Tiere (ATII, geschlossene Dreiecke, n=27) jeweils ohne Metoprolol-Behandlung, und mit zusätzlicher Metoprolol-Behandlung (KTR + Meto, offene Quadrate, n= 20) und (ATII + Meto, offene Dreiecke, n= 33). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte mit

Standardfehler; (* = $p < 0,05$ ATII und ATII + Meto vs. KTR für die Konzentrationen $10^{-8,5}$ bis $10^{-5,5}$ M, † = $p < 0,05$ ATII vs. ATII + Meto für die Konzentrationen $10^{-8,5}$ bis 10^{-5} M)

Die Abbildung 8 zeigt neben der durch ATII bedingten signifikanten Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für NTG die Auswirkung einer zusätzlichen Behandlung dieser Gruppe mit Metoprolol. Metoprolol verbesserte bei ATII behandelten Tieren sowohl die Sensitivität gegenüber NTG, mit einer ED_{50} von $7,46 \pm 0,05$ [-log M], als auch die maximale Relaxation von $99,84 \pm 0,09$ % und führte somit zu einer signifikanten Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve. Unter Behandlung der Kontrollgruppe mit Metoprolol zeigte sich mit einer ED_{50} von $7,82 \pm 0,07$ [-log M] und einer maximalen Relaxation von $99,86 \pm 0,09$ % keine Veränderung.

NTG	Sensitivität ED_{50} in (-log M)	Effektivität Maximalrelaxation in %
KTR (n=13)	$7,91 \pm 0,09$	$99,96 \pm 0,04$
KTR + Metoprolol (n=20)	$7,82 \pm 0,07$	$99,86 \pm 0,09$
ATII (n=27)	$7,28 \pm 0,05$ *	$99,51 \pm 0,22$ *
ATII + Metoprolol (n=33)	$7,46 \pm 0,05$ *†	$99,84 \pm 0,09$ *†

Tabelle 1: Effekte der siebentägigen ATII-Behandlung und der Metoprololgabe auf die Sensitivität und Effektivität einer nitroglycerininduzierten Vasodilatation in Aortenringen. Alle Werte sind mit dem Standardfehler und Mittelwert angegeben; (NTG = Nitroglycerin, ED_{50} = halbmaximale Wirkdosis, * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; † = $p < 0,05$ vs. ATII).

3.1.2 Effekte einer ATII-Behandlung auf die endothelabhängige Vasodilatation

Der physiologische Stimulus mit Acetylcholin (ACh) führt im Endothel zu einer Freisetzung von NO, das über eine cGMP Erhöhung die Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen bewirkt. Zur Untersuchung dieser endothelabhängigen Relaxation wurde eine ACh-Dosis-Wirkungskurve nach Zugabe von ACh in Konzentrationen von 10^{-9} bis $10^{-5.5}$ M in das Organbad erstellt.

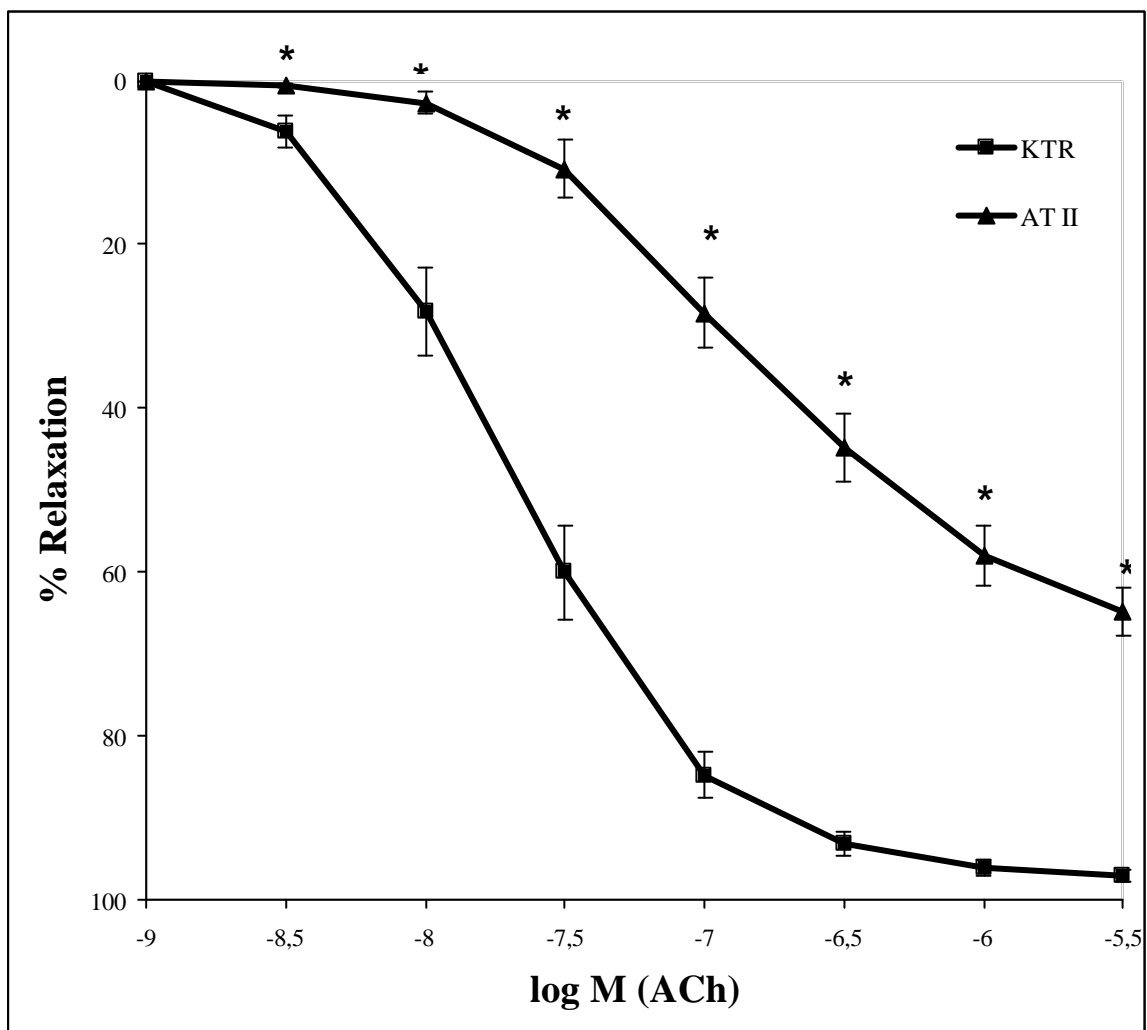


Abbildung 9: Dosis-Wirkungs-Kurve der Vasodilatation durch Acetylcholin (ACh) nach Vorkonstriktion durch Phenylephrin in aortalen Segmenten der Kontrollgruppe (KTR, geschlossene Quadrate, n=13) und der mit Angiotensin II behandelten Tiere (ATII, geschlossene Dreiecke, n=27). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte mit Standardfehler; (* = $p < 0,05$ vs. KTR für die Konzentrationen $10^{-8.5}$ bis $10^{-5.5}$ M)

Wie in der Abbildung 9 dargestellt, zeigte sich bei den Versuchen mit dem endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin (ACh) bei Kontrollgefäßen eine maximale Relaxation von $97,16 \pm 0,78\%$ bei einer ED_{50} von $7,67 \pm 0,08$ [-log M].

Die Behandlung mit Angiotensin II führte zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve, entsprechend einer endothelialen Dysfunktion. Sowohl die Maximalrelaxation ($64,84 \pm 4,11\%$) als auch die Sensitivität (ED_{50} $6,81 \pm 0,06$ [-log M]) waren dabei signifikant reduziert ($p < 0,05$).

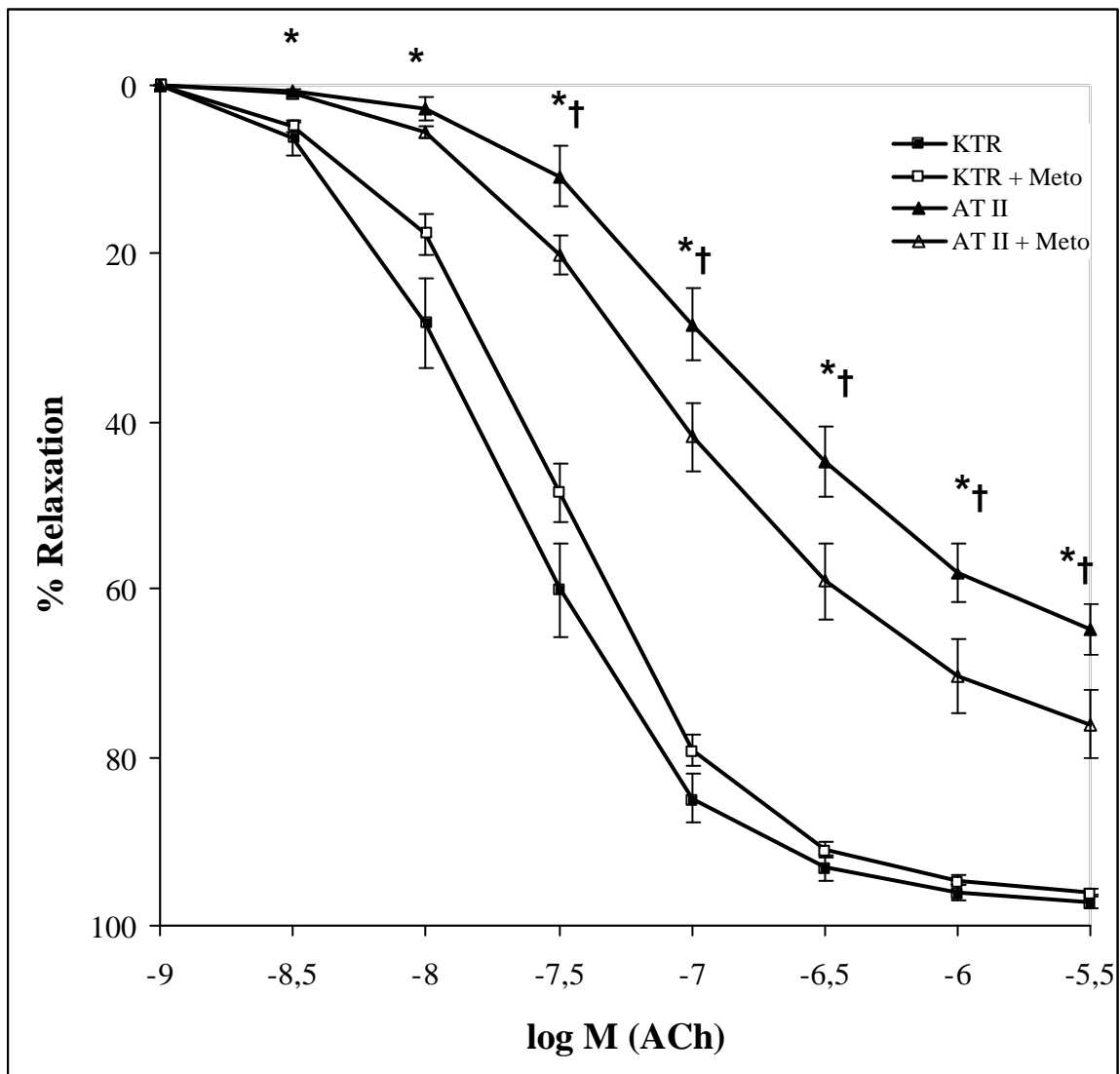


Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Kurve der Vasodilatation durch Acetylcholin (ACh) nach Vorkonstriktion durch Phenylephrin in aortalen Segmenten der Kontrollgruppe (KTR, geschlossene Quadrate, n=13) und der mit Angiotensin II behandelten Tiere (ATII, geschlossene Dreiecke, n=27) jeweils ohne und mit zusätzlicher Metoprolol-Behandlung (KTR + Metro, offene Quadrate, n=20; ATII + Metro, offene Dreiecke, n=33). Die Daten

sind präsentiert als Mittelwerte mit Standardfehler; (* = $p < 0,05$ ATII und ATII + Meto vs. KTR für die Konzentrationen $10^{-8,5}$ bis $10^{-5,5}$ M, † = $p < 0,05$ ATII vs. ATII + Meto für die Konzentrationen $10^{-7,5}$ bis $10^{-5,5}$ M)

Die Abbildung 10 zeigt neben der durch ATII bedingten signifikanten Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für ACh die Auswirkung einer zusätzlichen Behandlung dieser Gruppe mit Metoprolol. Die zusätzliche Behandlung mit Metoprolol führte zu einer signifikanten Verbesserung der endothelialen Dysfunktion entsprechend einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve mit Zunahme der Maximalrelaxation auf $76,08 \pm 3,0\%$ und der Sensitivität auf eine ED_{50} von $7,01 \pm 0,07$ [-log M]. Die Behandlung der Kontrollgruppe mit Metoprolol zeigte mit einer ED_{50} von $7,51 \pm 0,05$ [-log M] und einer maximalen Relaxation von $96,08 \pm 0,49\%$ keine Veränderung der endothelialen Dysfunktion.

ACh	Sensitivität ED_{50} in (-log M)	Effektivität Maximalrelaxation in %
KTR (n=13)	$7,67 \pm 0,08$	$97,16 \pm 0,78$
KTR + Metoprolol (n=20)	$7,51 \pm 0,05$	$96,08 \pm 0,49$
ATII (n=27)	$6,81 \pm 0,06$ *	$64,84 \pm 4,11$ *
ATII + Metoprolol (n=33)	$7,01 \pm 0,07$ *††	$76,08 \pm 3,0$ *††

Tabelle 2: Effekte der siebentägigen AT II-Behandlung und der Metoprololgabe auf die Sensitivität und Effektivität einer acetylcholininduzierten Vasodilatation in Aortenringen. Alle Werte sind mit dem Standardfehler und Mittelwert angegeben; (ACh = Acetylcholin, ED_{50} = halbmaximale Wirkdosis, * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; † = $p < 0,05$ vs. ATII).

3.2 Ergebnisse der Chemilumineszenz-Messung

3.2.1 Basale Superoxidanionenproduktion

Die lucigeninverstärkte Chemilumineszenz (LDCL) zeigte, dass die Angiotensin II-Behandlung zu einer Verdopplung des Superoxid-Signals gegenüber der Kontrollgruppe führte. Die Metoprolol-Behandlung von Kontrolltieren führte zu einer signifikanten Reduktion der vaskulären Superoxidproduktion. Ebenso reduzierte die zusätzliche Administration von Metoprolol die erhöhte $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung ATII-behandelter Ratten signifikant ($p < 0,05$), diese liegt aber noch immer signifikant über dem Niveau der Kontrolltiere ($p < 0,05$). Siehe Abbildung 11.

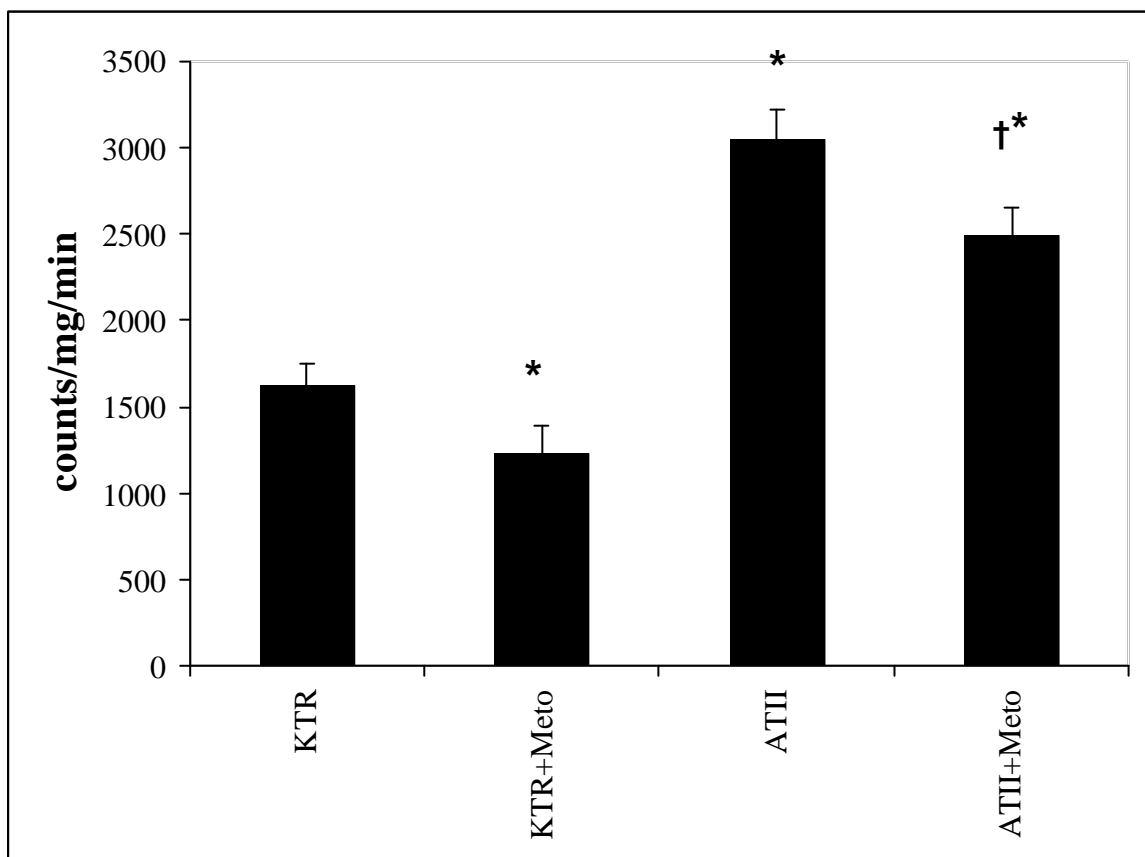


Abbildung 11: Lucigenin ($5\mu\text{mol}$)-verstärkte Chemilumineszenz (LDCL) zur Bestimmung der Superoxidkonzentration in aortalen Gefäßringen der vier Behandlungsgruppen (KTR: $n=25$, KTR + Meto: $n=10$, ATII: $n=49$, ATII + Meto: $n=13$). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte mit Standardfehler; (* = $p < 0,05$ vs. KTR, † = $p < 0,05$ vs. ATII)

3.2.2 NO-Synthase vermittelte Superoxidanionenproduktion

Wie bereits in früheren Studien (Skatchkov 1999) beschrieben, demaskiert die Inkubation mit LNNA eine funktionell entkoppelte eNOS.

In Abbildung 12 ist dargestellt, dass die Inkubation der Kontrollgefäße und der mit Metoprolol behandelten Gefäße mit dem NO-Synthase-Inhibitor N^G-Nitro-L-Arginin (LNNA, 1mM) zu einem signifikant gesteigerten Chemilumineszenz-Signal (LDCL: KTR + LNNA 2700 ± 436 counts/mg/min vs. KTR 1629 ± 119 counts/mg/min und KTR + Meto + LNNA 2508 ± 321 counts/mg/min vs. KTR + Meto 1235 ± 159 counts/mg/min) führte. Dagegen bewirkte die Inkubation der ATII-Gefäße mit LNNA eine signifikante Signalreduktion (ATII + LNNA 1960 ± 134 counts/mg/min vs. ATII 3047 ± 178 counts/mg/min).

Die Inkubation von Kontrollgefäßen und mit Metoprolol behandelten Kontrollgefäßen mit LNNA steigert demnach die Superoxidproduktion. Im Gegensatz dazu wird nach LNNA-Inkubation das LDCL-Signal der ATII-Gefäße signifikant vermindert, was auf eine wichtige Rolle der eNOS als $\cdot\text{O}_2^-$ Quelle bei ATII-behandelten Tieren hinweist. Bei gleichzeitiger Metoprolol-Behandlung führt LNNA zu einem gesteigerten CL-Signal (LDCL: ATII + Meto + LNNA 3654 ± 541 counts/mg/min vs. ATII + Meto 2486 ± 170 counts/mg/min). Dies deutet auf eine erhaltene basale NO-Freisetzung und somit eine funktionelle NOS hin entsprechend dem LNNA-Effekt in Kontrollgefäßen.

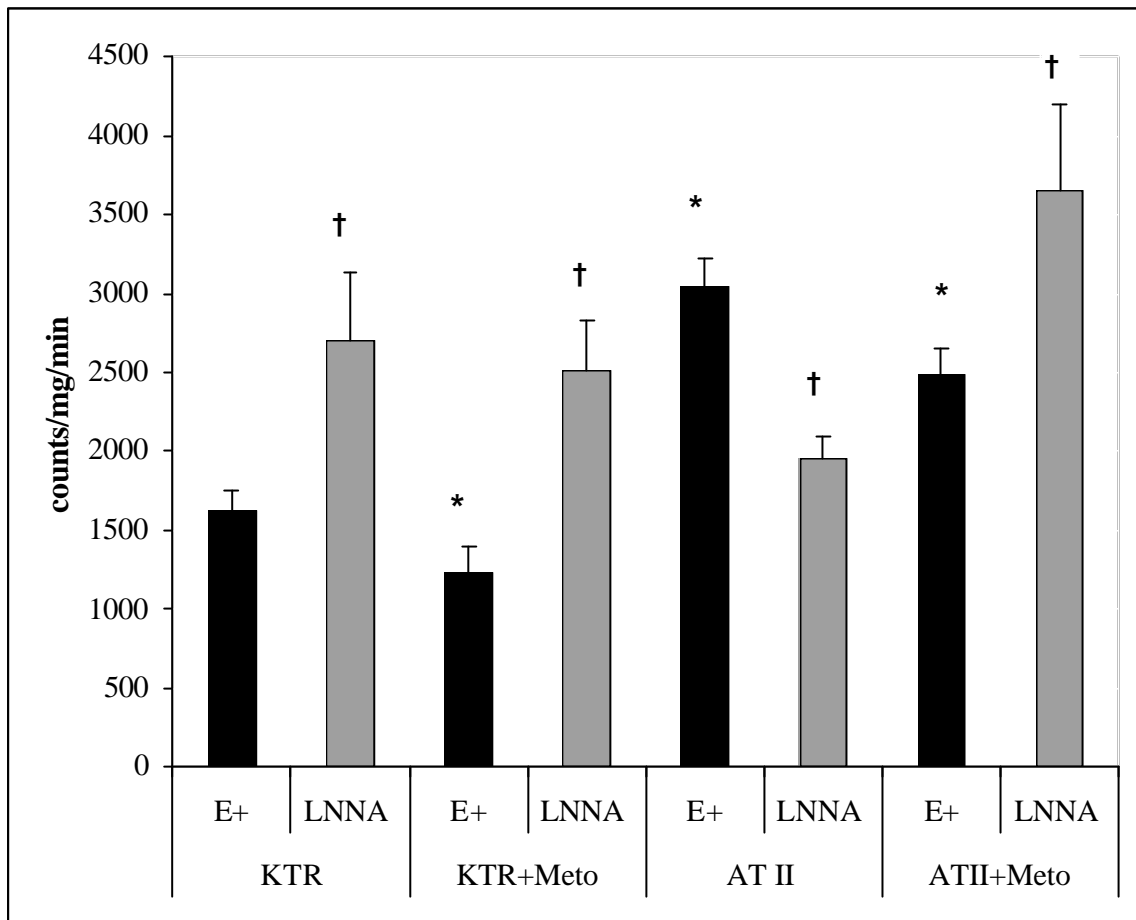


Abbildung 12: Lucigenin ($5\mu\text{M}$)-verstärkte Chemilumineszenz (LDCL) zur Bestimmung der Superoxidkonzentration in aortalen Gefäßringen ohne oder mit Inkubation (30min) mit dem NOS-Inhibitor N^{G} -Nitro-L-Arginin (LNNA, 1mM) (KTR + LNNA: n=5, KTR + Meto + LNNA: n=4, AT II + LNNA: n=15, AT II + Meto + LNNA: n=7). Die Daten sind präsentiert als Mittelwerte mit Standardfehler; (* = $p < 0,05$ vs. KTR; † = $p < 0,05$ vs. jeweilige Versuchsgruppe ohne LNNA-Inkubation).

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Mit der vorliegenden Studie konnte demonstriert werden, dass eine siebentägige ATII-Infusion zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Acetylcholin führt, entsprechend einer endothelialen Dysfunktion, die durch gleichzeitige Metoprolol-Behandlung signifikant verbessert wurde. Ebenso verbesserte Metoprolol die Sensitivität der Aortensegmente gegenüber Nitroglycerin. Desweiteren konnte Metoprolol die durch ATII bedingte Verdopplung der vaskulären Superoxidproduktion reduzieren.

Unter diesen Versuchsbedingungen zeigte die Inkubation mit dem NOS-Inhibitor LNNA, dass eine ATII-Behandlung zu einer NO-Synthase vermittelten Superoxidproduktion (eNOS-Entkopplung) führt und diese durch Metoprolol zumindest teilweise vermieden werden konnte.

Diese *in vivo* Ergebnisse implizieren, dass die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion bei einer ATII induzierten arteriellen Hypertonie unter den vorliegenden Versuchsbedingungen zumindest teilweise durch Metoprolol vermieden werden konnte. Zusätzlich zu den bekannten Eigenschaften der Betablocker konnte gezeigt werden, dass Metoprolol über antioxidative Eigenschaften verfügt, die sich im Rahmen einer *in vivo* Anwendung zusätzlich günstig auf die Behandlung der arteriellen Hypertonie und Progredienz einer Atherosklerose auswirken.

4.2 Mechanismen der ATII bedingten endothelialen Dysfunktion

Die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems für die Blutdruckregulation ist seit den Untersuchungen von Goldblatt et al. bekannt (Goldblatt et al. 1934). Über den direkten vasokonstriktorischen Effekt des Angiotensin II und die Aldosteron bedingte Salz- und Wasserretention erklärte sich der RAAS induzierte Hypertonus. Ein zusätzlicher ATII induzierter Mechanismus, der auch die hypertensive Wirkung erklären kann, ist in Untersuchungen von Rajagopalan et al. und Laursen et al. beobachtet worden

(Rajagopalan et al. 1996, Laursen et al. 1997). Sie zeigten, dass Angiotensin II über eine Erhöhung der vaskulären Superoxidanionenbildung und die dadurch bedingte EDRF/NO-Inaktivierung (Gryglewski et al. 1987) zu einem Verlust der endothelabhängigen Relaxation führt. Um zu beweisen, dass dieser durch ATII induzierte oxidative Stress nicht durch den hypertensiven Zustand per se erklärt werden kann, verglichen Rajagopalan et al. die Superoxidproduktion bei ATII und bei Noradrenalin induziertem Hypertonus. Während ATII zu einem signifikanten Anstieg der $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion führte, war diese unter Noradrenalin-Infusion nicht erhöht. Die Behandlung mit geringeren ATII-Dosen (0,3mg/kg/d) zeigte sogar einen lediglich minimalen blutdrucksteigernden Effekt bei signifikantem $\cdot\text{O}_2^-$ -Anstieg. Ebenso zeigte sich in der Studie von Laursen et al. nach ATII-Infusionsbehandlung ein signifikanter $\cdot\text{O}_2^-$ -Anstieg und eine verschlechterte EDRF abhängige Vasodilatation, wohingegen die Noradrenalin-Infusion eine ähnliche Blutdrucksteigerung, jedoch ohne $\cdot\text{O}_2^-$ -Anstieg bewirkte. Der oxidative Effekt des ATII im Gefäßendothel erklärt sich also unabhängig vom blutdrucksteigernden Effekt.

Diese Untersuchungen unterstützten die Ergebnisse vorangegangener Studien, dass ATII über eine Stimulation der NADPH abhängigen Oxidasen zur Bildung vaskulärer $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale führt (Griendling et al. 1994, Pagano et al. 1995). Die NADPH-Oxidasen wurden als wichtigstes oxidatives Enzymsystem identifiziert. Eine frühere Untersuchung unserer Arbeitsgruppe zeigte zusätzlich, dass die durch eine siebentägige ATII-Behandlung gesteigerte Expression der NADPH-Oxidase Proteinkinase C vermittelt ist, indem nachgewiesen wurde, dass die durch ATII gesteigerte Aktivität und Expression von NADPH-Oxidase-Untereinheiten durch den PKC-Inhibitor Chelerythrin gehemmt wurde (Mollnau et al. 2002).

Die ATII bedingte $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion bewirkt unter anderem die chemische Inaktivierung von NO, bevor es die lösliche Guanylatcyclase (sGC) stimulieren kann (Gryglewski et al. 1987). Die nachteiligen Konsequenzen der NO-Inaktivierung ergeben sich aus dessen bereits beschriebenen vasoprotektiven Eigenschaften. NO wirkt antiproliferativ auf glattmuskuläre Zellen (Garg et al. 1989), hemmt die Thrombozytenaggregation (Forstermann et al. 1989, Radomski et al. 1993, Lohen et al. 1995) und Neutrophilen-Adhäsion (Kubes et al. 1991, Loscalzo et al. 1995) und wirkt so insgesamt antiatherosklerotisch. Zusätzlich reagiert es unter oxidativem Stress mit endothelial gebildetem $\cdot\text{O}_2^-$ zum hochreaktiven Peroxynitrit (ONOO^-), wodurch eine Stimulierung

der Guanylatcyclyase entfällt. Peroxynitrit seinerseits reduziert die Aktivität der Guanylatcyclyase (Weber et al. 2001) und verstärkt über eine Lipidperoxidation die Entwicklung der Atherosklerose (White et al. 1994).

Entsprechend diesen Befunden zeigen die Ergebnisse der Organbaduntersuchungen der Aortensegmente als Folge der ATII-Behandlung eine endotheliale Dysfunktion, die sich in einer signifikanten Abnahme der Reaktivität der Aortensegmente gegenüber dem endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin ausdrückt (Abb. 9 und Tab. 2). Als wahrscheinlichste Ursache hierfür zeigte sich eine in Aortenringen von ATII behandelten Tieren gegenüber Kontrolltieren beinahe verdoppelte vaskuläre Superoxidproduktion (Abb. 11), die in den vorliegenden Untersuchungen mittels Lucigenin verstärkter Chemilumineszenz (CL) bestimmt wurde. Dabei reduzieren Superoxidanionen das Lucigenin-Kation und bilden ein Dioxethan-Zwischenprodukt, bei dessen Zerfall Lichtblitze entstehen, die mittels Szintillationscounter quantifiziert werden. Die Ergebnisse der CL bestätigen damit die Ergebnisse obengenannter Studien, dass ATII eine zentrale Rolle bei der Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen spielt.

Wie in weiterführenden Untersuchungen beschrieben, führt dieser gesteigerte oxidative Stress zu einer Störung der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade. Diese drückt sich durch eine verminderte Expression der sGC Untereinheiten α_1 und β_1 und letztlich durch eine Hemmung der cGKI Aktivität aus, die mittels reduzierter P-VASP-Expression nachgewiesen werden konnte (Mollnau et al. 2002). P-VASP ist das cGMP abhängige Phosphorylierungssubstrat des vasodilatatorstimulierenden Phosphoproteins (VASP), das als biochemischer Marker für die cGKI-Aktivität Anwendung findet. Bereits 1998 etablierten Smolenski et al. P-VASP als neuen Biomonitor für die cGKI-Aktivität (Smolenski et al. 1998). Durch die ATII bedingte verminderte Aktivität der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade ist auch die verminderte vasodilatatorische Antwort auf exogen zugeführtes NO zu erklären, die sich in einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve auf NTG ausdrückt. Zusätzlich ist ein direktes NO-scavenging durch eine gesteigerte Superoxidformation auch bei exogenen NO-Donatoren wahrscheinlich.

Als Superoxidquelle bei der ATII induzierten Hypertonie kommt die beschriebene NADPH-Oxidase in Betracht, deren Untereinheiten $p22^{phox}$, $nox1$, $nox4$, and $gp91^{phox}$ in diesem Modell vermehrt exprimiert werden (Mollnau et al. 2002). Als weitere mögliche

Superoxidquelle imponiert die endotheliale NO-Synthase (NOS III/eNOS). Dafür wurden die Auswirkungen einer zusätzlichen Inkubation der Kontrollgefäße und der mit ATII behandelten Gefäße mit dem NOS-Inhibitor N^G-Nitro-L-Arginin (L-NNA) verglichen. Während die L-NNA-Inkubation von Kontrollgefäßen zu einem signifikanten Anstieg der mittels Chemilumineszenz nachgewiesenen Superoxidproduktion führte, war die Radikalproduktion in ATII behandelten Gefäßen signifikant vermindert (Abb. 12). Die NOS III führt unter physiologischen Bedingungen zu einer Verminderung der Superoxidproduktion, so dass es unter Blockade der NOS III dementsprechend zu einem Anstieg der Superoxidproduktion kommt. Dagegen steigert die NOS III unter ATII bedingtem oxidativem Stress selbst noch die Superoxidbildung. In diesem Fall wird unter Blockade der NOS III die Superoxidproduktion vermindert. Der Funktionszustand der NOS, der durch eine deutlich reduzierte NO-Produktion und eine dafür erhöhte Superoxidbildung charakterisiert ist, wird als „NOS-Entkopplung“ bezeichnet. Unsere Arbeitsgruppe konnte ferner zeigen, dass eine ATII-Behandlung sogar zur gesteigerten Expression einer dementsprechend dysfunktionellen NOS III führt (Mollnau et al. 2002).

Verschiedene Untersuchungen erklärten den Mechanismus der NOS-Entkopplung damit, dass das unter pathologischen Bedingungen aus NO und $\cdot\text{O}_2^-$ gebildete Peroxynitrit (ONOO^-) wiederum Tetrahydrobiopterin (BH_4) oxidiert. Damit wird dieser wichtige NOS-Kofaktor ausgeschaltet (Laursen et al. 2001). Es ist gezeigt worden, dass die NOS III vor allem in Abwesenheit von BH_4 selbst $\cdot\text{O}_2^-$ produziert (Xia et al. 1998, Vasquez-Vivar et al. 1998). Als möglicher molekularer Mechanismus wurde postuliert, dass im Zustand der Entkopplung die vom reduzierenden zum oxidierenden Zentrum der NOS III fließenden Elektronen abgelenkt werden und dabei auf molekularen Sauerstoff und nicht auf das L-Arginin übertragen werden, was zu einer Bildung von Superoxid anstelle von NO führt (Xia et al. 1998; Vasquez-Vivar et al. 1998).

Ebenso wurde beobachtet, dass die durch eine entkoppelte NOS II reduzierte NO-Bioverfügbarkeit eine reduzierte Aktivierung der sGC und damit insgesamt der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade bewirkt und auch über diesen Weg zur endotheliale Dysfunktion führt (Oelze et al. 2000).

Insgesamt bedeutet dies, dass die NOS III als Enzym, das unter physiologischen Bedingungen zum Schutz des Endothels dient, unter oxidativem Stress über eine erhöhte Superoxidproduktion selbst die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion begünstigt.

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob dieser oxidative Effekt des ATII durch zusätzliche Behandlung mit Metoprolol, für das bisher nur durch *in vitro* Versuche geringe antioxidative Eigenschaften nachgewiesen werden konnten, beeinflusst wird.

4.3 Antioxidative Eigenschaften von Metoprolol

Eine erhöhte Bildung und Freisetzung von Sauerstoffradikalen bei meist gleichzeitig reduzierter NO-Freisetzung aus dem Endothel Stress spielt für die Entwicklung zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Die Kenntnis möglicher antioxidativer Eigenschaften von kardiovaskulär genutzten Medikamenten ist daher von großer Bedeutung. Für Metoprolol, einem Standardpräparat mit sehr weiter Verbreitung in der Behandlung des arteriellen Hypertonus und der koronaren Herzerkrankung, konnten bereits verschiedene Studien *in vitro* einen antioxidativen Effekt nachweisen (Mak und Weglicki 1988, Dunzendorfer 2000, Marton 2001).

Die exakten biochemischen Mechanismen, die den antioxidativen Effekt von Metoprolol erklären, sind bisher noch ungenügend bekannt. Da die Betablocker über eine unterschiedliche antioxidative Potenz verfügen, muss diese zumindest teilweise Betarezeptoren unabhängig zu erklären sein. Die Ergebnisse der bisherigen Studien weisen auf verschiedene Mechanismen hin, die den Stoffwechsel der Sauerstoffradikale beeinflussen.

Es kommen dabei kardiovaskuläre Effekte in Betracht, über die es zu einer gesteigerten Sauerstoffradikalbildung kommt. Gelingt es, solche Effekte zu unterdrücken, könnte gleichzeitig die Sauerstoffradikalbildung gehemmt werden.

Die Überlegung, ob ein solcher, indirekter antioxidativer Effekt die bekannte blutdrucksenkende Wirkung der Betablocker sein könnte, wurde in verschiedenen Studien untersucht. Die Arbeitsgruppen um Prabha et al. und Kumar et al. beschrieben mit ihren *in vitro* Studien, dass es unter den Bedingungen eines essentiellen Hypertonus

in polymorphen Leukozyten zu einem Anstieg freier Radikale ($\cdot\text{O}_2^-$ und H_2O_2) und gleichzeitigem Abfall von Antioxidantien, wie der Superoxiddismutase (SOD) und Vitamin E kommt (Prabha et al. 1990, Kumar et al. 1993). Nach erfolgreicher antihypertensiver Behandlung, unter anderem mit Metoprolol, kam es wiederum zu einem deutlichen Abfall der freien Radikale. Dabei konnten Prabha et al. nicht klären, ob der Anstieg freier Radikale der Effekt oder die Ursache des unkontrollierten Hypertonus war, dementsprechend auch nicht den genauen antioxidativen Effekt von Metoprolol erklären. Kumar et al. untersuchten daher die Auswirkung der zusätzlichen *in vitro* Behandlung unterschiedlicher Hypertonie induzierender Hormone (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Angiotensin II und andere) auf die $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion. Dabei konnte lediglich unter ATII induziertem Hypertonus eine erhöhte $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung nachgewiesen werden. Wenn also nicht der Hypertonus per se zu einer gesteigerten $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion führt, stellte sich die Frage, ob der adrenorezeptorassoziierte, antihypertensive Effekt von Metoprolol den nachgewiesenen antioxidativen Effekt erklärt. Was für einen direkten antioxidativen Effekt dieser Substanzen sprach, war der zusätzliche Nachweis einer durch Radikale induzierten Lipidperoxidation und deren Hemmung durch die untersuchten Substanzen, wie unter anderem Metoprolol (Kumar et al. 1993).

Die Annahme, dass die geringere Sauerstoffradikalbildung nach Stimulation von Leukozyten in Gegenwart von Betablockern über einen adrenorezeptorunabhängigen Mechanismus abläuft, wurde durch Dunzendorfer et al. bekräftigt (Dunzendorfer et al. 2000). Diese zeigten, dass die hemmende Wirkung von Metoprolol auf die Sauerstoffradikalbildung und Chemotaxis von Neutrophilen durch β -Agonisten (Orciprenalin) nicht aufgehoben wurde.

Für die gesamte Gruppe der Betablocker zeigten sich schon in verschiedenen Studien adrenorezeptorunabhängige Eigenschaften zur Reduktion oxidativen Stress, so dass man sie zum Teil als Sauerstoffradikal-Abfänger („Scavenger“) bezeichnete. Carvedilol ist dabei der am besten untersuchte Betablocker, für den antioxidative Effekte nachgewiesen wurden (Yue et al. 1992, Lysko et al. 2000, Marton et al. 2001).

Mak und Weglicki wiesen in einer *in vitro* Studie für fünf Betablocker, unter anderem Metoprolol, einen radikalabfangenden Effekt nach, indem sie mit Betablockern vorbehandelte Sarkolemm-Membranen einem System zur Generierung von Sauerstoffradikalen aussetzten (Mak und Weglicki 1988). Es zeigte sich eine Hemmung

der Lipidperoxidation durch die untersuchten Substanzen, die in Abhängigkeit von der Lipophilie anstieg (Propranolol > Pindolol > Metoprolol > Atenolol > Sotalol).

Weitere *in vitro* Studien untersuchten Metoprolol auf einen möglichen radikalabfangenden Effekt. So induzierten Marton et al. bei Erythrozyten durch Inkubation mit einer radikalgenerierenden Substanz (Phenazin-Methosulfat) und zusätzlicher Inkubation verschiedener klinisch genutzter und experimenteller Substanzen, diese auf ihre antioxidative Potenz (Marton et al. 2001). Wie bei anderen Zellen auch, kommt es bei Erythrozyten bei einem Übergewicht freier Radikale gegenüber antioxidativen Schutzmechanismen zu einer strukturellen und funktionalen Zellschädigung. Diese Schädigungen konnten durch einige der untersuchten Substanzen verhindert bzw. vermindert werden. Unter anderen zeigte Metoprolol schwache, jedoch statistisch signifikante antioxidative Effekte.

In einer der wenigen *in vivo* Studien untersuchten Theres et al. den Einfluss von Metoprolol auf den oxidativen Stress bei ischämisch bedingter Herzinsuffizienz (Theres et al. 2000). Dafür induzierten sie an Ratten durch Koronarligatur (LAD) einen Myokardinfarkt und wiesen im Intervall gesteigerte Lipidperoxid- Konzentrationen und eine verminderte Aktivität antioxidativer Enzyme als Zeichen gesteigerten oxidativen Stress nach. Wurden diese Tiere nach der akuten Myokardphase mit einer Kombination aus Metoprolol und dem ACE-Hemmer Ramipril behandelt, wurde im Verlauf ein geringerer myokardialer Stress beobachtet, der mit einer Verbesserung der morphologischen und funktionellen Herzinsuffizienzzeichen einherging. Als wesentlich für den reduzierten oxidativen Stress wurde die Zunahme des enzymatischen antioxidativen Schutzes durch die Substanzen Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase im Myokard ausgewiesen. Neben dieser Studie, die jedoch zusätzlich zeigte, dass der antioxidative Effekt der Kombinationstherapie aus Metoprolol und ACE-Hemmer der jeweiligen Monotherapie deutlich überlegen war, gab es bisher kaum Ergebnisse weiterer *in vivo* Studien. So könnten die vorliegenden Erkenntnisse über antioxidative Eigenschaften von Metoprolol die klinische Anwendung noch erweitern.

4.4 Effekte einer *in vivo* Metoprolol-Behandlung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie ergaben, dass eine zusätzlich zur Angiotensin II-Infusion durchgeführte Metoprolol-Behandlung in einer Dosierung von 100mg/kg/d die endotheliale Dysfunktion verbesserte.

Im Organbad konnte die durch ATII-Infusion bewirkte Abnahme der Sensitivität und Effektivität der Aortensegmente gegenüber dem Vasodilatator NTG mit einer signifikanten Rechtsverschiebung der Konzentrationswirkungskurve durch gleichzeitige Metoprolol-Behandlung signifikant verbessert werden (Abb. 8). Ebenso war die Konzentrationswirkungskurve für den endothelabhängigen Vasodilatator ACh unter Metoprolol signifikant nach links verschoben, im Sinne einer Verminderung der ATII bedingten endothelialen Dysfunktion (Abb. 10) mit einer signifikanten Zunahme der Sensitivität und Effektivität gegenüber ACh (Tab. 2).

Die Ergebnisse wurden gestützt durch die Ergebnisse der mittels Chemilumineszenz detektierten vaskulären $\cdot\text{O}_2^-$ -Messung. Die durch ATII-Infusion bedingte Steigerung des Superoxid-Signals um etwa 80% konnte durch gleichzeitige Metoprolol-Behandlung signifikant reduziert werden (Abb. 11). Ein weiteres Ziel bestand darin, diesen antioxidativen Effekt ebenso wie vorangegangene Untersuchungen (Kumar et al. 1993, Dunzendorfer et al. 2000) unabhängig von den adrenorezeptorblockierenden Eigenschaften zu erklären.

Ein wichtiger Aspekt ergibt sich durch die Wiederherstellung der zuvor durch ATII entkoppelten, dysfunktionalen eNOS durch Metoprolol. Die Inkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NNA unter ATII-Behandlung zeigte eine signifikant verminderte $\cdot\text{O}_2^-$ -Produktion, entsprechend einer eNOS-Entkopplung. Analog zu anderen oxidativen Stress-Modellen produziert hier die entkoppelte eNOS selbst Superoxid, so dass die Hemmung dieser zu einer verminderten Superoxidproduktion führt. Unter zusätzlicher Metoprolol-Behandlung zeigt sich hingegen nach L-NNA-Inkubation eine gesteigerte Superoxidbildung (Abb. 13). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Metoprolol-Behandlung die ATII bedingte Entkopplung der eNOS verhindern könnte.

Insgesamt stehen die vorliegenden Beobachtungen im Einklang mit vorhergegangenen, obengenannten *in vitro* Untersuchung, in denen Metoprolol einen zwar marginalen, aber meist signifikanten antioxidativen Effekt aufzeigte.

Weitere Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um den Hinweis auf mögliche antioxidative Eigenschaften und eine dadurch verbesserte endotheliale Dysfunktion durch Metoprolol zu unterstützen. So wären auch hier Messungen der VASP/P-VASP-Expression aufschlussreich hinsichtlich einer möglichen Normalisierung der NO/cGMP/cGKI-Signalkaskade. Verschiedene Studienmodelle mit erhöhtem oxidativen Stress ergaben eine verminderte Expression des cGMP abhängigen Phosphorylierungssubstrats P-VASP als Zeichen einer gehemmten Aktivität der cGKI (Oelze et al. 2000, Mulsch et al. 2001, Mollnau et al. 2002). Entsprechend sollte es unter Metoprolol induzierter Verminderung des oxidativen Stress zu einer Erhöhung des cGMP abhängigen Phosphorylierungssubstrats P-VASP kommen.

4.5 Zusammenfassung und klinische Bedeutung

Angiotensin II spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen. Über eine Aktivierung von NADH/NADPH-Oxidasen bewirkt es die Bildung von Sauerstoffradikalen, die endothelial gebildetes NO inaktivieren. Ebenso verursacht ATII eine eNOS-Entkopplung mit einer NO-Synthase vermittelten Superoxidproduktion und reduzierter basaler NO-Produktion.

Die Ergebnisse des vorliegenden tierexperimentellen Modells zeigen, dass eine sieben-tägige ATII-Behandlung zu den oben genannten Veränderungen in den untersuchten Aortensegmenten führt und somit hier für das Entstehen einer endothelialen Dysfunktion verantwortlich ist.

Die Beobachtungen zeigen darüber hinaus, dass eine zusätzliche *in vivo* Behandlung mit Metoprolol den durch ATII-Infusion induzierten oxidativen Stress vermindert, unter anderem durch eine mögliche Wiederherstellung der durch ATII entkoppelten eNOS.

Effekte einer *in vivo* Behandlung mit Metoprolol auf die Ausbildung eines ATII bedingten oxidativen Stress:

- **Verbesserung der relaxierenden Antwort der Aortensegmente auf endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatoren**
- **Reduzierung der 'O₂' -Produktion**
- **Positive Auswirkung auf die Entkopplung der eNO-Synthase**

Abbildung 13: Effekte einer *in vivo* Behandlung mit Metoprolol auf die Ausbildung eines ATII bedingten oxidativen Stress

Diese tierexperimentellen Beobachtungen haben möglicherweise klinische Bedeutung. Die Ergebnisse dieser *in vivo* Studie unterstützten die Ergebnisse bisheriger *in vitro* Studien (Mak und Weglicki 1988, Kumar 1993, Dunzendorfer 2000, Marton 2001) bezüglich des positiven Effektes des kardioselektiven Betablockers Metoprolol auf eine Verminderung des oxidativen Stress. Gleichzeitig wird somit zusätzlich zur bereits weitläufigen Indikationsstellung durch seine positiven hämodynamischen Effekte, der Einsatz von Metoprolol als potentiell antioxidatives Therapeutikum bei koronarer Herzerkrankung, chronischer Herzinsuffizienz und arterieller Hypertonie unterstützt.

5 Anhang

5.1 Geräte, Materialien, Chemikalien und Pufferlösungen

5.1.1 Geräte

Heizvorrichtung für das Wasserbad:

Haake C 1 (Fisons) HS 89100;

Fa. Haake, Karlsruhe

Laborwaage:

Kern 510;

Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Albstadt

Präzisionswaage:

Mettler H51;

Mettler-Toledo GmbH, Gießen

pH-Meter:

Mikroprozessor pH-Meter CG 840;

Schott Geräte GmbH, Hofheim am Ts.

Rührmixer :

IKA Combimag RCH Nr. 42547 ;

Jahnke & Kunkel GmbH & Co KG, IKA Werk, Staufen i. Breisgau

Tischzentrifuge :

Eppendorf Zentrifuge 5414 S;

Eppendorf -Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Ultrazentrifuge:

Centrikon T-2170; Rotor Nr. 7 (TFT70.13, S/N 8037);

Kontron Instruments, Mailand, Italien

Vortexer:

Eppendorf Vortexer;

Eppendorf -Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Organbäder:

Peter Hatch

University of Iowa, Department of Chemistry, Glasshop

Iowa City, Iowa, USA

Haltevorrichtung für Organbadanlage:

Four position laboratory mount for tissue bath;

Kent Scientific Cooperation, Litchfield, Connecticut, USA

Tranducer für Organbadanlage:

Isometric transducer with base amplifier and wall plug-in transformer;

Kent Scientific Cooperation, Litchfield, Connecticut, USA

Haltevorrichtung für Transducer:

Transducer positioner (for tissue tensioning);

Kent Scientific Cooperation, Litchfield, Connecticut, USA

Wasserheizung für Organbadanlage:

Haake B3;

Fa. Haake, Karlsruhe

Szintillationszähler:

Beckman LS 1801 (LS 5800 Series) +

Constant Temperature Accessory (Stufe 1) Beckman LS 3801 (LS 5800 Series);

Beckman Instruments, Scientific Intr. Division, Irvine, California, USA

Reinstwasseranlage:

Reinstwasseranlage Typ Clear;

Wasseraufbereitung- u. Regenerierstation GmbH, Barsbüttel

5.1.2 Pharmaka und Chemikalien

G. Pohl – Boskamp GmbH & Co., Hohenlockstedt

“Nitrolingual-Ampullen”, Glyceroltrinitrat

“Nitrolingual-Infusion”, Glyceroltrinitrat

Linde Gase, Hannover:

Carbogen

Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Wyhlen:

Heparin (Liquemin[®])

Merck KgaA, Darmstadt:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ M=147,02 g/mol

D-Glucose wasserfrei M=180,16 g/mol

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ M=228,23 g/mol

KCl	M=74,56 g/mol
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	M=246,48 g/mol
NaCl	M=58,44 g/mol
NaHCO ₃	M=84,01 g/mol
NaOH 10M	
HCl 10 M	

Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen:

Thiamylal-Na (Surital[®])

Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA:

Acetylcholin

Angiotensin II

Indometacin

KH₂PO₄

Na-HEPES

L-N^G-Monomethylarginin (L-NMMA)

Lucigenin

Phenylephrin

Serotonin

5.1.3 EDV (Hard- und Software)

Computer: Apple Macintosh Power PC 7200/90

Drucker: Apple Macintosh Laserwriter Select 360

digitale Umwandlung der Transducersignale: ADInstruments Mac/Lab 8e

benutzte Programme:

ADInstruments: Chart

Cricket Software: Cricket Graph

Corel Draw 7.0

Microsoft: MS Excel 5.0

MS Word 2000

National Institute of Health: NIH Image

5.1.4 Sonstige Materialien

Braun Melsungen AG, Melsungen: Spritzen, Kanülen

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg: Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml,

Combitips, Pipetten

Packard Instrument Company, Meriden, USA: Econo Glass Vials

Probengefäße 20 ml mit Schraubverschluss

Reagenzgläser 10 ml

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht: Pipettenspitzen 10-200 μ l, 200-1000 μ l, 1-10 ml,

Mikroküvetten

Schott Duran, Mainz: Erlenmeyerkolben 100-5000 ml, Glaszylinder 500-2000 ml

6 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACh	Acetylcholin
AO	Aorta
ATI	Angiotensin I
ATII	Angiotensin II
Ca	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cGKI	cGMP abhängige Proteinkinase I
cGMP	3', 5', cyclo Guanosinmonophosphat
CL	Chemilumineszenz
Cu	Kupfer
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
E-	Endothel entfernt
E+	Endothel intakt
ECL	enhanced chemiluminescence
ED ₅₀	halbmaximale Wirkdosis
EDRF	endothelium derived relaxation factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	elektronische Datenverarbeitung
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase = NOSIII
Fa.	Firma
g	Gramm
GC	Guanylatcyclase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunde
H ⁺	Proton
HCl	Salzsäure
hν	Lichtquant
IE	internationale Einheiten
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase = NOS II
IP ₃	Inositoltriphosphat

IPM	Impulse pro Minute
K_2HPO_4	Kaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KH-Puffer	Krebs-Hepes Puffer
KTR	Kontrolle
l	Liter
LICL	Lucigenin induzierte Chemilumineszenz
L-NNA	N^G -Nitro-L-Arginin
log	negativ dekadischer Logarithmus
M	molar
μ	Mikro
Meto	Metoprolol
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
max.	maximal
min.	Minuten
ml	Milliliter
mol	Mol
MS	Microsoft
n	Stichprobengröße
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase = NOS I
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NTG	Nitroglycerin = Glyceroltrinitrat
O_2	Sauerstoff
$\cdot O_2^-$	Superoxidanion = Sauerstoffradikal
OH^-	Hydroxylradikal
$ONNO^-$	Peroxyinitrit
p	Signifikanz
PC	Personalcomputer
PGI_2	Prostazyklin

PKC	Proteinkinase C
P-VASP	phosphoryliertes vasodilatatorstimulierendes Phosphoprotein
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SEM	standard error of the mean
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SH-Gruppen	Sulfhydrylgruppen
SOD	Superoxiddismutase
StDev	Standardabweichung
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VASP	vasodilatatorstimulierendes Phosphoprotein
vs.	versus

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1.** Physiologie des Renin-Angiotensin-Systems mit Wirkungsprofil der AT₁/AT₂-Rezeptoren und unterschiedlichen blockierenden Substanzgruppen **Seite 4**
- Abbildung 2.** Klassifikation der Betablocker **Seite 7**
- Abbildung 3.** Hämodynamische Effekte der Betablocker **Seite 8**
- Abbildung 4.** Zusammenfassung der Ziele dieser Studie **Seite 11**
- Abbildung 5.** Schematisch dargestelltes Messprinzip der isometrischen Organbaduntersuchung **Seite 14**
- Abbildung 6.** Schematisch dargestelltes Messprinzip der Superoxiddetektion **Seite 17**
- Abbildung 7.** Dosis-Wirkungs-Kurve der Vasodilatation durch Nitroglycerin nach Vorkonstriktion durch Phenylephrin in aortalen Segmenten der Kontrollgruppe und der mit AT II behandelten Tiere **Seite 21**
- Abbildung 8.** Dosis-Wirkungs-Kurve der Vasodilatation durch Nitroglycerin nach Vorkonstriktion durch Phenylephrin in aortalen Segmenten der Kontrollgruppe und der mit Angiotensin II behandelten Tiere - jeweils ohne Metoprolol-Behandlung, und mit zusätzlicher Metoprolol-Behandlung **Seite 22**
- Abbildung 9.** Dosis-Wirkungs-Kurve der Vasodilatation durch Acetylcholin nach Vorkonstriktion durch Phenylephrin in aortalen Segmenten der Kontrollgruppe und der mit AT II behandelten Tiere **Seite 24**
- Abbildung 10.** Dosis-Wirkungs-Kurve der Vasodilatation durch Acetylcholin nach Vorkonstriktion durch Phenylephrin in aortalen Segmenten der Kontrollgruppe und der mit AT II behandelten Tiere - jeweils ohne und mit zusätzlicher Metoprolol-Behandlung **Seite 25**
- Abbildung 11.** Lucigeninverstärkte Chemilumineszenz zur Bestimmung der Superoxidkonzentration in aortalen Gefäßringen der vier Behandlungsgruppen **Seite 27**
- Abbildung 12.** Lucigenin-verstärkte Chemilumineszenz zur Bestimmung der Superoxidkonzentration in aortalen Gefäßringen ohne oder mit Inkubation mit dem NOS-Inhibitor NG-Nitro-L-Arginin **Seite 29**

- Abbildung 13.** Effekte einer *in vivo* Metoprolol-Behandlung auf die Ausbildung eines AT II bedingten oxidativen Stresses **Seite 39**
- Tabelle 1.** Effekte einer siebentägigen AT II-Behandlung und der Metoprololgabe auf die Sensitivität und Effektivität nitroglycerininduzierter Vasodilatationen in Aortenringen **Seite 23**
- Tabelle 2.** Effekte einer siebentägigen AT II-Behandlung und der Metoprololgabe auf die Sensitivität und Effektivität acetylcholininduzierter Vasodilatationen in Aortenringen **Seite 26**

8 Literaturverzeichnis

Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* 1991; 324 (16): 1098-104

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol* 1996; 271: C1424-C1437

Braun-Menendez E, Page IH. Suggested revision of nomenclature: angiotensin. *Science* 1958; 127:242

Bristow MR. Pathophysiologic and pharmacologic rationales for clinical management of chronic heart failure with beta-blocking agents. *Am J Cardiol.* 1993; 71: 12C-21C

Bristow MR. β -adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 2000; 101:558-69

CIBIS Investigators and Committees. A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). *Circulation* 1994; 90 (4): 1765-73

Cohen R. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 105-28

Dessy C, Saliez J, Ghisdal P, Daneau G, Lobysheva II, Frerart F, Belge C, Jnaoui K, Noirhomme P, Freron O, Balligand J-L. Endothelial β_3 -adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation β -blocker nebivolol. *Circulation* 2005; 112: 1198-1205

Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Modulation of neutrophil migration and superoxide anion release by metoprolol. *J Moll Cell Cardiol* 2000; 32: 915-24

Förstermann U, Mügge A, Alheid U, Bode SM, Frolich JC. Endothelium-derived relaxing factor (EDRF): a defence mechanism against platelet aggregation and vasospasm in human coronary arteries. *Eur Heart J* 1989; 10 Suppl F: 36-43

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6

Garg UC, Hassid A. Nitric oxid-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-7

Goldblatt H, Lynch J, Hanzel RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension, I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 1934; 59: 347-79

Gottlieb SS, Mc Carter RJ, Vogel RA. Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339(8): 489-97

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994; 74: 1141-48

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986 Apr 3-9; 320: 454-6

Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immun Meth* 1987; 97: 209-13

Harrison DG, Armstrong ML, Freimann PC, Heistad DD. Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J Clin Invest* 1987; 80: 1808-11

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze , Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88: 14-22

Hjalmarson A, Elmfeldt D, Herlitz J, Holmberg S, Malek I, Nyberg G, Ryden L, Swedberg K, Vedin A, Waagstein F, Waldenstrom A, Waldenstrom J, Wedel H, Wilhelmssen L, Wilhelmsson C. Effect on mortality of metoprolol in acute myocardial infarction. A double-blind randomised trial. *Lancet* 1981; 318: 823-7

Hjalmarson A, Olsson G. Myocardial infarction. Effects of beta-blockade. *Circulation* 1991; 84: VI 101-7

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:4651-5

Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 1993; 19: 59-66

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; 95: 588-93

Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apo-E-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103: 1282-88

Lefkowitz R, Caron M, Stiles G. Mechanism of membrane-receptor regulation. Biochemical, physiological, and clinical insights derived from studies of the adrenergic receptors. *N Engl J Med*. 1984; 310: 1570-9

Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J* 1993; 7: 328-38

Lopez BL, Christopher TA, Yue TL, Ruffolo R, Feuerstein GZ, Ma XL. Carvedilol, a new beta-adreno-receptor blocker antihypertensive drug, protects against free-radical-induced endothelial dysfunction. *Pharmacology* 1995; 51: 165-73

Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38: 87-104

Lysko PG, Webb CL, Gu JL, Ohlstein EH, Ruffolo RR; Yue TL. A comparison of carvedilol and metoprolol antioxidant activities in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 277-81

Mak IT, Weglicki WB. Protection by beta-blocking agents against free radical-mediated sarcolemmal lipid peroxidation. *Circ Res* 1988; 63:262-6

Marton Z, Halmosi R, Horvath B, Alexy T; Kesmarsky G, Vekasi J, Battyany I, Hideg K, Toth K. Scavenger effect of experimental and clinically used cardiovascular drugs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 745-53

MERIT-HF Study Group. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in-Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999; 353: 2001-7

Minor RL, Myers PR, Guerra R, Bates JN, Harrison DG. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990; 86: 2109-

Mohazzab HKM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 1994; 266 (Heart Circ Physiol 35): H2568-72

Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassegue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling KK, Münzel T. Effects of angiotensin II on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circulation* 2002; 90: e58-e65

Mollnau H, Schulz E, Daiber A, Baldus S, Oelze M, August M, Wendt M, Walter U, Geiger C, Agrawal R, Kleschyov AL, Meinertz T, Münzel T. Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 615-21

Münzel T, Sayegh H, Bruce A, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin. Invest.* 1995; 95: 187-194

Murad F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* 1994; 26: 19-33

Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Münzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res* 2000; 87:999-1005

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993 ; 91 : 2546-51

Packer M, Bristow M, Cohn J, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH, for the US Carvedilol Heart Failure Study Group. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. *N Engl J Med* 1996; 334: 1349-55

Packer M. Beta-adrenergic blockade in chronic heart failure: principles, progress, and practice. *Prog Cardiovasc Dis.* 1998; 41: 39-52

Packer M, Coats AJS, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohasci P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, De Mets DL, for the Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group. *N Engl J Med* 2001; 344: 1651-8

Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol* 1995; 268 (Heart Circ Physiol): H2274-80

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333 (Jun): 664-6

Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10480-4

Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JGF, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, Lubsen J, Lutiger B, Metra M, Remme WJ, Torp-Pedersen C, Scherhag A, Skene A, for the COMET investigators. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET). *Lancet* 2003; 362 (9377): 7-13

Prabha PS, Das Un, Koratkar R, Sagar PS, Ramesh G. Free radical generation, lipid peroxidation and essential fatty acids in uncontrolled essential hypertension. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1990; 41:27-33

Radomski MW, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S. Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1380-2

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* 1996; 97: 1916-23

Sigmund M, Jakob H, Becker H, Hanrath P, Schumacher C, Eschenhagen T, Schmitz W, Scholz H, Steinfath M. Effects of metoprolol on myocardial beta-adrenoreceptors and Gi alpha-proteins in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996; 51:127-32

Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mulsch A, Harrison DG, Sindermann I, Meinertz T, Münzel T. Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 254:319-24

Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Hönig-Liedl P, Jarchau T, Hoschuetzky H, Walter U. Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem* 1998; 273; 20029-35

Theres H, Wagner KD, Schulz S, Strube S, Leiterer KP, Romberg D, Gunther J, Scholz H, Baumann G, Schimke I. Oxygen radical system in chronic infarcted rat heart: the effect of combined beta blockade and ACE inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35:708-15

Tigerstedt R, Bergmann RG. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol* 1898; 8: 223-71

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BSS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA. Superoxide generation by endothelial nitric oxide Synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 9220-25

Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E, Wallentin I. Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1975 Oct; 37(10): 1022-36

Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1360-7

White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, et al. (1994) Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 1044-8

Wikstrand J, Warnold I, Olsson G, Tuomilehto J, Elmfeldt D, Berglund G. Primary prevention with metoprolol in patients with hypertension. Mortality results from the MAPHY study. *JAMA* 1988; 259: 1976-82

World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 1999; 17: 151-83

Wright CE, Rees DD, Moncada S. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 48-57

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

Yue TL, Cheng HY, Lysko PG, McKenna PJ, Feuerstein R, Gu JL, Lysko KA, Davis LL, Feuerstein GZ. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263:92-8

9 Danksagung

Zu aller erst danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Münzel (Direktor der II. Medizinischen Klinik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) für die Themenstellung und die Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas. Als erfahrener Wissenschaftler hat er mich mit kritischen Hinweisen und motivierenden Worten begleitet. Hierfür und für die von ihm zur Verfügung gestellten Arbeitsmittel danke ich ihm.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Meinertz, dem stellvertretenden Direktor des Universitären Herzzentrums Hamburg Eppendorf dafür danken, dass er die Erstellung meiner Dissertation in seiner Klinik ermöglicht und gefördert hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Hink (Johannes Gutenberg-Universität Mainz), der mich mit großer Geduld in die benötigten Methoden und deren Interpretation eingewiesen hat. Außerdem stand er mir bei vielen Fragen bei der Auswertung meiner Untersuchungen und Ausarbeitung der Ergebnisse stets freundlich und hilfreich zur Seite.

Besonderer Dank gilt aber auch meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfsmittel 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 und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Alexandra von Sandersleben

11 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN:

- Name: Alexandra Karen von Sandersleben
- Adresse: Schlüterstr. 20, 20146 Hamburg
- Geburtsdatum: 13.07.1973
- Geburtsort: Hamburg
- Familienstand: ledig

SCHULBILDUNG:

- 1979-1983 Grundschule Turmweg in Hamburg
- 1983-1992 Wilhelm-Gymnasium in Hamburg
- 1992 Abitur, Note: 2,3

STUDIUM:

- April 1993 Beginn des Studiums für Humanmedizin an der Universität Hamburg
- März 1995 Ärztliche Vorprüfung
- 1995 Famulatur in Pathologie (Prof. Caselitz, AK Altona, Hamburg)
- 1995 Famulatur in Innerer Medizin/Gastroenterologie (Prof. Judmaier, Universitätsklinik Innsbruck)
- 1995/1996 Auslandssemester an der Leopold-Franzens-Universität Innsbruck
- 1996 Famulatur in Chirurgie (Prof. de Heer, Elim Krankenhaus, Hamburg)
- 1996 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
- 1997 Famulatur in Traumatologie und Geburtshilfe (Tygerberg-Hospital, University of Stellenbosch, Südafrika)

- 1998 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
- 1998-1999 Praktisches Jahr
 Innere Medizin: Prof. Greten, UKE, Hamburg
 Anästhesiologie: Dr. Moecke, AK Barmbek, Hamburg
 Chirurgie: PD Dr. Dörner, Diakoniekrankenhaus Alten Eichen, Hamburg
- 1999 dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)
- 11/99- 05/01 Ärztin im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- 05/2006 Anerkennung als Fachärztin für Anästhesiologie

BERUFSERFAHRUNG:

- seit 05/2001 Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Direktor Prof. Schulte am Esch / Prof. Goetz