

Medizinische Klinik III  
Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie  
Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf  
Direktor Prof. Dr. Thomas Meinertz  
Martinstraße 52  
20246 Hamburg

**Effekte einer experimentell induzierten arteriellen Hypertonie  
auf die Gefäßfunktion in Rattenaorten**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin vorgelegt von  
Martin Bodenschatz  
aus Hamburg

Hamburg, 2005

## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	2
1. Einleitung .....	7
2. Material und Methoden .....	13
2.1 Tiergruppen .....	13
2.2 Präparation.....	13
2.2.1 Implantation der ATII-Pumpen .....	13
2.2.2 Materialentnahme .....	14
2.3 Messung der Nativringe im Organbad.....	14
2.4 Messung der Superoxidanionenproduktion in intakten Gefäßsegmenten mit Hilfe der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz .....	17
2.5 Bestimmung der P-VASP-Aktivität .....	19
2.6 Bestimmung der Superoxidkonzentration mittels Dihydroethidinfärbung .....	20
2.7 Messung der PKC-Aktivität .....	20
2.8 Messung der Blutdruckwerte.....	21
3. Auswertung.....	21
3.1 Datenerfassung und Datenverarbeitung.....	21
3.2 Datenanalyse und statistische Methoden.....	22
4. Ergebnisse.....	22
4.1 Ergebnisse der Messungen in der Organbadanlage.....	22
4.1.1 Effekte der Angiotensin II-Gabe auf die endothelabhängige Vasorelaxation durch Ach .....	22
4.1.2 Effekte der Angiotensin II-Gabe auf die endothelunabhängige Vasorelaxation durch Nitroglyzerin.....	23
4.1.3 PhE-vermittelte Vasokonstriktion .....	24
4.2 Ergebnisse der Radikal-Messungen mittels Lucigeninverstärkter Chemilumineszenz .....	25
4.3 Ergebnisse der VASP-Messung.....	26
4.4 Ergebnisse der Dihydroethidinfärbung.....	26
4.5 Ergebnisse der PKC-Bestimmungen .....	27
4.6 Ergebnisse der Blutdruckmessungen.....	28
5. Diskussion .....	29
5.1 Effekte einer Angiotensin II Behandlung auf die Endothelfunktion.....	29
5.2 Effekte von ATII auf die vaskuläre Superoxidproduktion .....	30
5.3 Effekte von ATII auf die NO- sowie Superoxidproduktion durch die NOS .....	30
5.4 Dihydroethidinfärbung .....	31
5.5 Effekte der ATII-Gabe auf den NO-Pathway.....	32
5.6 Organbaduntersuchungen .....	32
5.7 Bedeutung der PKC-abhängigen Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen als radikalbildendes System.....	33
5.8 Anteil des Endothels an der Superoxidgeneration.....	33
5.9 Mögliche Ursachen einer quantitativen Störung des Superoxid-Nachweises .....	34
5.10 Zusammenfassung und klinische Aspekte.....	34
6. Anhang .....	36
6.1 Geräte.....	36
6.2 Pharmaka und Chemikalien:.....	37
6.3 Pufferlösungen.....	39
6.4 Computer und Zubehör:.....	40
6.5 Sonstige Materialien .....	40
6.6 Antikörper.....	40

7. Literaturverzeichnis .....	41
8. Danksagung .....	50
9. Erklärung .....	51
10. Lebenslauf .....	51

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Auswirkungen des Bluthochdruckes auf das Organsystem .....	7
Abbildung 2: Das Renin-Angiotension-Aldosteron-System(RAAS).....	8
Abbildung 3: Mechanismus der NO-Wirkung am glatten Muskel.....	9
Abbildung 4: Wirkmechanismus der NOS.....	10
Abbildung 5: Messprinzip der Organbadanlage.....	16
Abbildung 6: Aufbau des Beckman-Counters.....	18
Abbildung 7: Endothelabhängige Vasodilatation durch Acetylcholin (ACh) bei Kontrolltieren und mit ATII behandelten Tieren .....	23
Abbildung 8: Endothelunabhängige Vasorelaxation durch Nitroglyzerin (NTG) bei Kontrolltieren und unter ATII-Infusion.....	24
Abbildung 9: Vasokonstriktion unter Stimulation mittels PhE.....	24
Abbildung 10: Ergebnisse der Radikal-Messungen .....	25
Abbildung 11: Darstellung der VASP/P-VASP-Aktivität mittels Immunoblot.....	26
Abbildung 12: Superoxidanfärbung mittels DHE .....	27
Abbildung 13: PKC-Aktivität.....	28

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

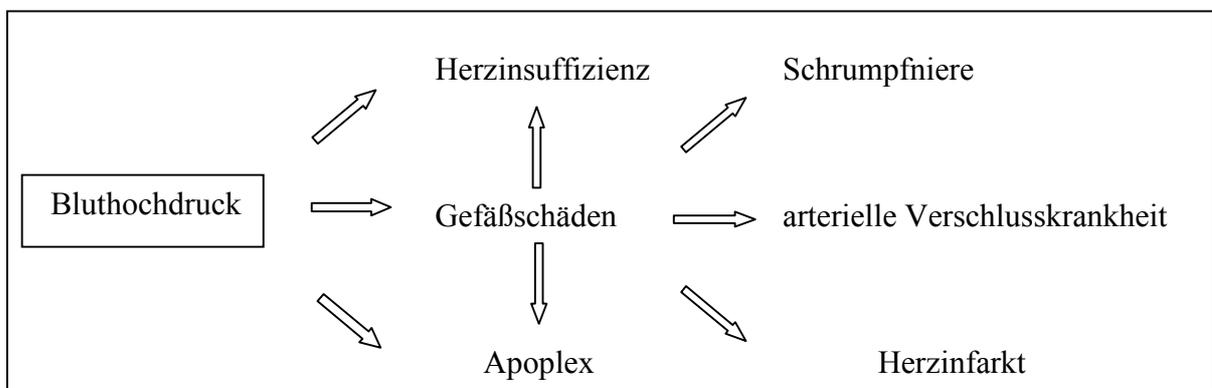
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACh	Acetylcholin
ANOVA	analysis of variance
Ao	Aorta
ATII	Angiotensin II
AT-1	Rezeptorsubtyp des Angiotensin II
AT-2	Rezeptorsubtyp des Angiotensin II
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CL	Chemilumineszenz
DPI	Diphenyl Iodonium
DHE	Dihydroethidium
DWK	Dosis-Wirkungskurve
ED <sub>50</sub>	Dosis, mit der die halbmaximale Wirkung erreicht wird
E <sup>-</sup>	Endothel entfernt
E <sup>+</sup>	Endothel intakt
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
HG	Homogenat
HLP	Hyperlipoproteinämie
KCl	Kaliumchlorid
KTR	Kontrolle
KCN	Kaliumzyanid
KHK	Koronare Herzkrankheit
L-NMMA	L-Monomethyl-Arginin
LNNA	N-Nitro-L-Arginin
NA	Nierenarterie
NADPH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduzierte Form
NOS	NO-Synthase
NPN	Nitroprussid-Natrium
·NO	Stickstoffmonoxid
NTG	Glyceroltrinitrat
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion

pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PHE	Phenylephrin
PKC	Proteinkinase C
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
p-VASP	phosphoryliertes vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SEM	standard error of the mean
sGC	lösliche (soluble) Guanylatcyclase
SOD	Superoxid-Dismutase
VSMC	vascular smooth muscle cell = glatte Gefäßmuskelzelle
WHO	World Health Organization
X	Xanthin
XO	Xanthinoxidase

## 1. Einleitung

Die arterielle Hypertonie wird von der WHO definiert als ein Blutdruck, der bei mehrmaliger Messung an mindestens zwei verschiedenen Tagen systolisch höher als 140mm Hg oder diastolisch höher als 90mm Hg ist (Chalmers et al. 1999) .

Es handelt sich um eine endemisch anzutreffende Volkskrankheit. Die arterielle Hypertonie gilt als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten von kardio-, zerebro-, und renovaskulären Erkrankungen (s. Abb.1). Oft lassen sich keine direkten Ursachen finden, man spricht in diesem Falle von einer primären (essentiellen) Hypertonie.



**Abbildung 1:** Auswirkungen des Bluthochdruckes auf das Organsystem<sup>1</sup>

An der physiologischen Regulation des Blutdruckes ist das RAAS wesentlich beteiligt (s.Abb. 2), typisch für eine essentielle Hypertonie ist eine oft messbare Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), das für die vasokonstriktorisches Effekte verantwortlich ist (Rothermund et al. 1998).

Auch eine salzreiche Ernährung und erhöhte Katecholaminspiegel tragen mit dazu bei (Laragh et al. 1972; Limas et al. 1980).

Davon abzugrenzen sind sekundäre Hypertonien, die z.B. in Folge von endokrinologischen Störungen wie Morbus Cushing oder einem Phäochromozytom entstehen oder renovaskuläre Ursachen haben.

Beim Patienten erfolgt die Diagnosestellung häufig erst, wenn die Hypertonie schon längere Zeit besteht und deren Schäden sich morphologisch und funktionell dann nachweisen lassen. Die klinische Bedeutung wird von der Münchner Bluthochdruckstudie unterlegt. Sie zeigt,

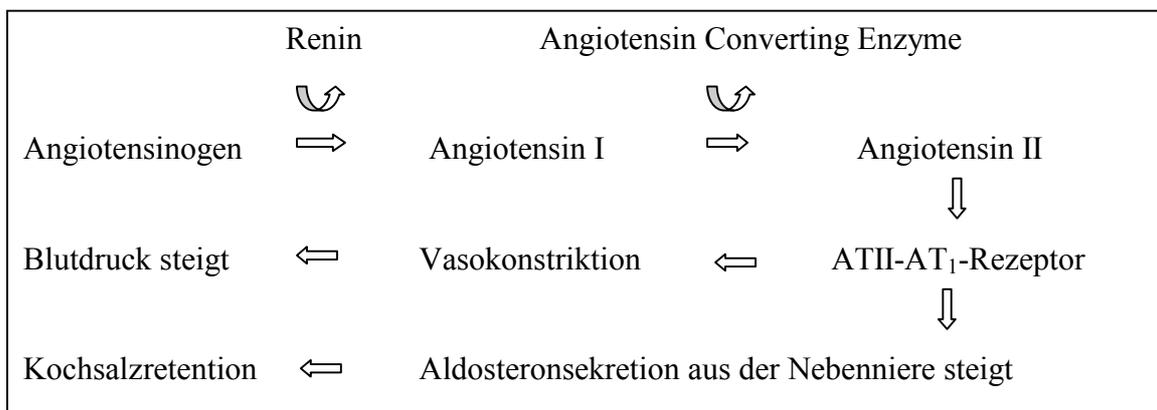
<sup>1</sup> Eigene Darstellung

dass in der Altersgruppe der 40-49jährigen eine Prävalenz des Bluthochdruckes von über 20% bei den Männern bzw. von über 10% bei den Frauen herrscht. (Härtel et al. 1988).

ATII entfaltet seine Wirkung durch Bindung an Oberflächenrezeptoren. Diese werden in mehrere Subtypen untergliedert, von denen der ATII-Typ 1 (AT1) und der ATII-Typ 2 (AT2) am besten charakterisiert sind. Der AT1-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Die molekularen und zellulären Wirkungen von ATII in kardiovaskulären und renalen Zellen werden fast ausschliesslich von AT1-Rezeptoren bestimmt (Kim & Iwao, 2000). Er lässt sich durch selektive AT1-Blocker wie z.B. Losartan blockieren.

Der AT2-Rezeptor ist ebenfalls ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, seine Eigenschaften sind bisher noch nicht ausreichend geklärt worden (Hayashida et al. 1996). Postuliert werden vasodilatierende, antiproliferative und auch antioxidative Wirkungen.

In Blutgefäßen, die einer arteriellen Hypertension ausgesetzt sind, lassen sich morphologische Veränderungen nachweisen, z.B. kommt es zur Proliferation der glatten Muskulatur.



**Abbildung 2:** Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)<sup>2</sup>

Hierfür wird von Daemen et al. die Wirkung von ATII am AT1-Rezeptor verantwortlich gemacht (Daemen et al. 1991). Folge der Hypertrophie der glatten Gefäßmuskulatur sowie anderer, durch den AT1-Rezeptor vermittelten Umbau- und Fibrosierungsprozesse ist ein Funktions- und damit ein Elastizitätsverlust der inneren Gefäßschichten, woraus sich wiederum funktionelle Einbußen wie z.B. ein Verlust der Relaxationsfähigkeit ergibt (Griendling et al. 1994).

<sup>2</sup> Eigene Darstellung

Die meisten experimentellen Hypertoniemodelle zeigen, dass ein erhöhter Blutdruck sekundär zu einer Abnahme der endothelabhängigen Relaxation führt (Lüscher et Vanhoutte 1991).

Als lokaler Gegenspieler des RAAS als Vasokonstriktor kommt die endotheliale NO-Synthese in Betracht. Das von ihr freigesetzte NO ist einer der stärksten und am besten charakterisierten Vasodilatoren.

Die Bedeutung von Endothelzellen für die Regulation des Gefäßtonus wurde 1980 von Furchgott und Zawatzki an Kaninchen näher untersucht. Sie zeigten, dass die Relaxation von isolierten Aortenringen durch Acetylcholin von intaktem Gefäßendothel abhängig ist. Acetylcholin mußte folglich die Bildung einer Substanz in den Endothelzellen stimulieren, die wiederum eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen verursacht (Furchgott et Zawatzki 1980). Da die chemische Natur dieses Moleküls unbekannt war, wurde sie von Furchgott EDRF: „endothelium-derived relaxing factor“ genannt.

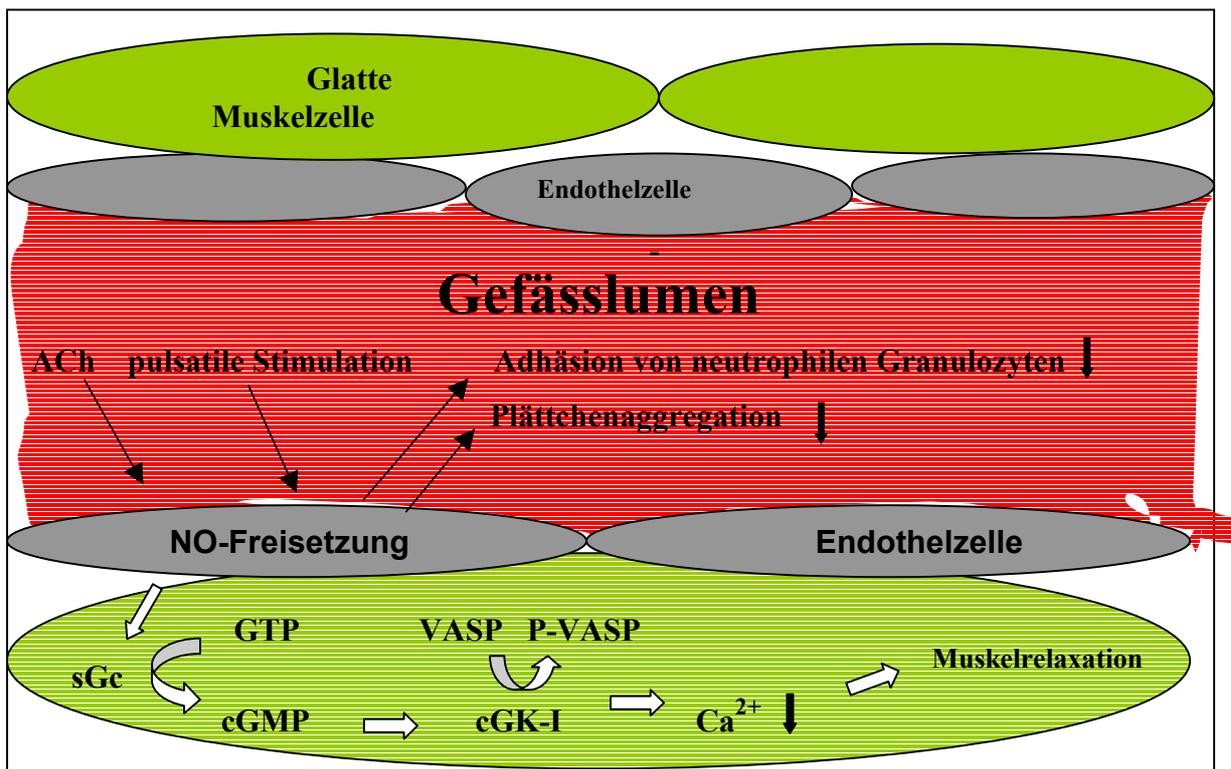
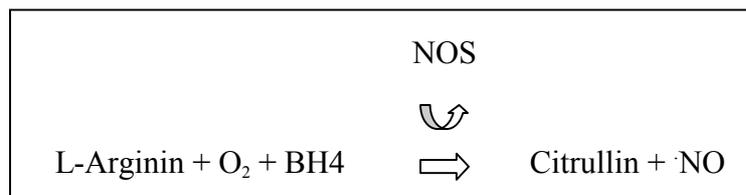


Abbildung 3: Mechanismus der NO-Wirkung am glatten Muskel<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Eigene Darstellung

1986 wurde von Förstermann et al. und Ignarro et al. gezeigt, dass die Gefäßerweiterung dieser als "endothelium-derived relaxing factor", kurz EDRF bezeichneten Substanz, über eine direkte Aktivierung der cytosolischen Guanylyl-Cyclase vermittelt wird. Diese bildet cGMP, welches über eine Aktivierung von cGMP-abhängigen Kinasen letztendlich die Relaxation auslöst.

Palmer et al. wiesen im Jahre 1987 nach, dass es sich bei EDRF nicht um ein komplexes Molekül, sondern einfach um das freie Radikal Stickstoffmonoxid ( $\cdot\text{NO}$ ) handelt.



**Abbildung 4:** Wirkmechanismus der NOS

$\cdot\text{NO}$  ist ein sehr kleines Molekül, welches sowohl in hydrophober als auch in hydrophiler Umgebung löslich ist und daher leicht durch die verschiedensten Medien diffundieren kann. Die intrazelluläre Synthese von  $\cdot\text{NO}$  erfolgt über mehrere Redox-Schritte aus dem Guanidinstickstoff von L-Arginin unter Verwendung von Sauerstoff. Weiterhin entscheidend für die Bildung von  $\cdot\text{NO}$  ist der NO-Synthase-Kofaktor Tetrahydrobiopterin, kurz BH<sub>4</sub>.

$\cdot\text{NO}$  ist eine Substanz mit hoher Reaktionsbereitschaft, was seine Reichweite stark beschränkt. In löslicher Form wird  $\cdot\text{NO}$  innerhalb von wenigen Minuten zu inaktiven Stickstoff-Sauerstoffverbindungen oxidiert. In biologischen Systemen liegt die Halbwertszeit zwischen 3 und 30 Sekunden, da es als freies Radikal rasch durch Radikalfängersysteme inaktiviert wird (Moncada et al. 1991, Moncada et al. 1993, Abu-Soud et al. 1995).

$\cdot\text{NO}$  wird kontinuierlich von der endothelialen  $\cdot\text{NO}$ -Synthase (NOS III oder auch eNOS) im Gefäßendothel freigesetzt und ist damit im kardiovaskulären System für die Regulation des Blutflusses und des Gefäßwiderstandes verantwortlich. Das im Endothel gebildete  $\cdot\text{NO}$  diffundiert in die Tunica media und bewirkt dort durch Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) eine Steigerung der Produktion des sekundären Botenstoffes zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) (Murad et al. 1987). Zyklisches GMP aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen vom Typ I und II (cGK-I, cGK-II).

Die Aktivierung von cGK-I über den NO/cGMP-Signalweg bewirkt die Phosphorylierung verschiedener Proteine und damit die Absenkung des intrazellulären freien Calciumspiegels, was letztendlich zur Relaxation des Gefäßmuskels führt (Lohmann et al. 1997).

Eine Schlüsselrolle für cGK-I bei diesem Prozess konnte anhand von cGK-I-defizienten Mäusen demonstriert werden (Pfeifer et al. 1998). Bei diesen Mäusen wurde eine völlige Unterbrechung des NO/cGMP-Signalweges beobachtet, was eine Abhängigkeit der NO-induzierten Vasorelaxation von der cGK-I Aktivität und/oder Expression verdeutlicht. Smolenski et al. konnten 1998 zeigen, dass sich aus der Analyse des Phosphorylierungszustandes des cGK-I Substrates Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein (VASP) an Serin 239 (P-VASP) die cGK-I Aktivität in intakten Blutplättchen und kultivierten Endothel- und Gefäßmuskelzellen darstellen läßt und dies somit als nützlicher Biomonitor für NO-Effekte verwendet werden kann.

Dieser Mechanismus kann bei einer Reihe von Erkrankungen gestört sein.

Neben der eNOS gibt es noch zwei weitere Isoformen der NO-Synthase, die neuronale NOS (NOS I) und die NOS II (iNOS). Sie spielen bei der physiologischen Regelung des Gefäßtonus aber eine weniger wichtige Rolle.

Lockette et al. konnten am Tiermodell zeigen, dass sich die endothelabhängige Relaxation bei arterieller Hypertonie verschlechtert (Lockette et al. 1986). Panza et al. zeigten an Patienten mit einer essentiellen Hypertonie, dass deren von intaktem Endothel abhängige Gefäßrelaxation vermindert ist (Panza et al. 1990).

Von weiterer Bedeutung ist das nach luminal diffundierende NO, es beeinflusst z.B. das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten. Es konnte gezeigt werden, dass es unter Gabe von NOS-Inhibitoren infolge einer fehlenden NO-Wirkung zu einer vermehrten Aggregation der Plättchen kommt (Moncada et al. 1989; Radomski et al. 1987). Außerdem ist es an der Regulation von Wachstums- und Entzündungsprozessen beteiligt, vermindert die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand und reduziert die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (Moncada et Higgs 1993).

Langfristig schützt es die Gefäßwand vor atherosklerotischen Veränderungen und der sog. endothelialen Dysfunktion (Haendeler et al. 1999; Zeiher et al. 1995).

Eine Hypothese für diese endotheliale Dysfunktion ist das sogenannte "Uncoupling" der NOS. Dieser Zustand wird heute in erster Linie über eine vermehrte Bildung von Peroxynitrit erklärt, welches wiederum in der Lage ist, den wichtigen eNOS Kofaktor Tetrahydrobiopterin zu oxidieren. Dies wiederum führt dazu, dass Elektronen, die normalerweise zur Oxidation von Arginin zu NO benötigt werden, auf molekularen

Sauerstoff übertragen werden, wobei Superoxidanionen entstehen. Dies wiederum bedeutet, dass aus einem antiatherosklerotischen Enzym ein proatherosklerotisches Enzym geworden ist und die NO-Synthase somit ein Enzym mit zwei Gesichtern darstellt.

Damit trägt sie neben anderen Enzymen wie z.B. der NAD(P)H-Oxidase und der Xanthinoxidase unter physiologischen, insbesondere aber auch unter pathologischen Bedingungen zur vaskulären Superoxidproduktion bei.

Hink und Heitzer konnten daraufhin zeigen, dass das Phänomen einer entkoppelten NO-Synthase in anderen pathologischen Stoffwechselsituationen wie z.B. Diabetes mellitus (Hink et al. 2001, Heitzer et al. 2000) als auch bei chronischen Rauchern (Heitzer et al. 1996) vorliegt. Durch Substitution der Kofaktoren, in erster Linie Tetrahydrobiopterin, konnte z.B. Heitzer et al. die Endothelfunktion bei Patienten mit Diabetes Typ II verbessern (Heitzer et al. 2000). Landmesser et al. konnten diesen Effekt auch bei hypertensiven Mäusen zeigen, die Gabe von Tetrahydrobiopterin führte zu einem signifikanten Abfall der vaskulären Superoxidproduktion (Landmesser et al. 2003).

Langfristig schützt eine funktionierende NO-Synthase die Gefäßwand vor atherosklerotischen Veränderungen und der sog. endothelialen Dysfunktion (Haendeler et al. 1999; Zeiher et al. 1995).

### **Zielsetzung:**

In dieser Arbeit soll anhand eines Tiermodells näher untersucht werden, durch welche Veränderungen es in Rattenaorten zu einer endothelialen Dysfunktion, die durch ATII-Behandlung verursacht wurde, kommt. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Superoxidproduktion sowie auf die Funktionalität der NOS gelegt.

Es soll weiterhin geklärt werden, welche Rolle die NOS unter ATII-induzierter Hypertonie hinsichtlich der Superoxidbildung spielt und ob es durch eine Blockade der NOS zu messbaren Veränderungen der Superoxidanionenkonzentration kommt. Dies geschah mit Hilfe der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz sowie durch Gefässanfärbungen mit DHE. Um das Ansprechverhalten der Gefäße auf vasoaktive Substanzen zu prüfen, wurden Kontrollgefäße und Gefäße von Tieren, die mit ATII behandelt wurden im Organbad verglichen.

Weiterhin wurde Messungen der P-VASP-Konzentration als Endglied im NO-Pathway zum indirekten Vergleich der Bioverfügbarkeit von NO zwischen den Versuchsgruppen benutzt.

Zur Bestimmung der topographischen Herkunft des Superoxids innerhalb der verschiedenen Gefäßschichten erfolgte eine Anfärbung von Gefäßquerschnitten mit der Substanz Dihydroethidin.

Die Aktivität der PKC wurde bestimmt, um ihre Bedeutung bei der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidasen unter ATII vermittelter Hypertonie zu untersuchen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Tiergruppen**

Die Versuche wurden mit Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld) durchgeführt. Es wurden zwei Gruppen gebildet, eine Kontrollgruppe, und eine Gruppe, in der experimentell eine Hypertension erzeugt wurde. Dies geschah in Anlehnung an die Methode von Rajagopalan (Rajagopalan et al. 1996).

Die Tiere beider Gruppen waren hinsichtlich Alter, Geschlecht und Körpergewicht identisch. Das Körpergewicht lag dabei zwischen 210 und 250 g. Sie wurden mit Standardfutter ernährt und hatten einen Wasserspender in ihrem Käfig.

### **2.2 Präparation**

#### **2.2.1 Implantation der ATII-Pumpen**

Die Tiere wurden in einem Glasgefäß, das vorher mit Ether gesättigt wurde, anästhesiert. Nach Wirkungseintritt wurden die Tiere aus dem Glasbehälter genommen, zur Fortführung der Anästhesie wurde ihnen eine ethergetränkte Maske aufgesetzt, die jener von Schimmelbusch ähnelte.

Beiden Tiergruppen wurde ein Bereich am dorsalen Thorax zwischen den Schulterblättern mit einem Rasierer komplett von Fell befreit, dann wurde subkutan eine osmotische Pumpe der Firma Alza Corp. (Alzet Model 2002) implantiert. Bei der Kontrollgruppe wurden die Pumpen mit Kochsalzlösung befüllt, bei den hypertensiven Tieren mit ATII. Durch den Einsatz dieser Pumpen konnte eine kontinuierliche Freisetzung von ATII garantiert werden. Die tägliche freigesetzte Dosis an ATII betrug damit 0,7mg ATII/kg/d. Einem Teil beider Gruppen wurde gleichzeitig der PKC-Inhibitor Chelerythrin beigemischt, die tägliche Freisetzung betrug 5mg/kg/d. Nach Implantation der Pumpe erfolgte ein Hautverschluss in Klammernahttechnik.

### **2.2.2 Materialentnahme**

Am Morgen des Untersuchungstages, 7 Tage nach Implantation der Pumpen, wurden die Tiere in einem Glasgefäß, das vorher mit Ether gesättigt wurde, anästhesiert. Nach Wirkungseintritt wurden die Tiere aus dem Glasbehälter genommen, zur Fortführung der Anästhesie wurde ihnen eine ethergetränkte Maske aufgesetzt, die jener von Schimmelbusch ähnelte.

Dann wurde der Brustkorb zügig eröffnet. Nach Darstellung der thorakalen Aorta wurde ein ca. 4 cm langes Stück der Aorta deszendens unter Vermeidung von Zug- und Druckkräften bis auf Höhe der Arteriae renales freipräpariert und entnommen.

Trotz Heparininjektion im Gefäßlumen verbliebene Blutbestandteile wurden mit Hilfe einer Feinnadelkanüle durch langsame Perfusion mit Krebs-HEPES Pufferlösung entfernt.

Die Aorta wurde dann in Krebs-HEPES-Puffer (KH-Puffer) auf Eis mit einer feinen Pinzette und einer Federschere von überschüssigem perivaskulärem Bindegewebe befreit.

Während des gesamten Präparationsvorganges wurde darauf geachtet, dass sich die Gefäßinnenwände nicht berührten und dass das Endothel durch äußere Einflüsse keinen Schaden nahm.

Anschließend wurde die Aorta unter Zuhilfenahme eines Skalpells in 5 mm lange Ringsegmente geschnitten. Jeweils ein Aortenring wurde dann durch vorsichtiges Greifen an der äußersten Wandschicht und unter Vermeidung von Quetschungen bzw. anderen Irritationen in einen mit 10 ml KH-Puffer befüllten Reagenzienbehälter gegeben und bis zu Beginn des Experimentes auf Eis gehalten.

### **2.3 Messung der Nativringe im Organbad**

Die Organbadanlage diente zur Messung von Tonusveränderungen von Gefäßsegmenten. Dazu wurden die Aortenringe in ein Kraftwandlersystem eingespannt, das Kontraktionsveränderungen der Aortenringe erfassen kann.

Die Messung fand in einem offenem System (Organbad) statt, es wurde nach einem standardisierten Schema mit verschiedenen Pharmaka inkubiert.

Für die Untersuchungen wurden bis zu 8 Behälter des Organbades mit P-Pufferlösung aufgefüllt: Außerdem wurde dem Puffer zur Unterdrückung der Prostaglandinsynthese Indomethacin zugesetzt (Endkonzentration 10 mmol/L).

Vor Beginn der Versuchsreihen erfolgte der Einsatz von endothelabhängigen Substanzen zur Überprüfung der Intaktheit der Endothelfunktion (Ohara et al. 1993).

Während der Untersuchungen wurde die Pufferlösung bei einer Temperatur von 37,0 Grad Celsius gehalten, desweiteren wurde sie mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begast. Die Aortensegmente wurden nun über 2 feine, zu Dreiecken gebogene Drähte in ein Organbad pro Aortenring eingehängt.

Jeweils ein Dreieck wurde starr befestigt, das andere über einen langen Draht mit einem Kraftaufnehmer verbunden. Dieser wandelte die pharmakainduzierten Tonusveränderungen der glatten Gefäßmuskulatur in elektrische Signale um, die dann nach digitaler Umwandlung (Mac-Lab/8e) in den Computer (Apple Macintosh, Power PC, Mac-Lab Programm) gespeist und graphisch sichtbar gemacht wurden.

In der ersten Stunde wurde die Ausgangsspannung schrittweise erhöht, um die Bedingungen für eine optimale Vasomotorik zu erreichen.

In den vorausgegangenen Experimenten wurde diesbezüglich ein Wert von 5g als optimale Zugspannung gefunden. Hierdurch wurde in Anlehnung an den Frank-Starling-Mechanismus das Aktin-Myosin-Gefüge bis zum Erreichen der Vordehnung mit der größten Kraftentwicklung bei isometrischer Kontraktion aufgedehnt und somit eine bestmögliche Effizienz der Muskelfasern erzielt.

Danach wurde eine Dosis von 80 mmol KCl inkubiert und abgewartet, bis eine konstante isometrische Kontraktion registriert werden konnte.

Es wurde noch eine Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) mit ansteigenden Konzentrationen von KCl durchgeführt (5 mmol, 10 mmol, 20 mmol, 40 mmol, 80 mmol, 100 mmol). Der hierbei erreichte maximale Tonus wurde für die weiteren Messungen als 100%-Referenz gesetzt.

Im Anschluss daran wurde zweimal gewaschen und gewartet bis die Gefäßspannung durch Spontanrelaxation wieder auf den Ausgangswert von 5g gesunken war.

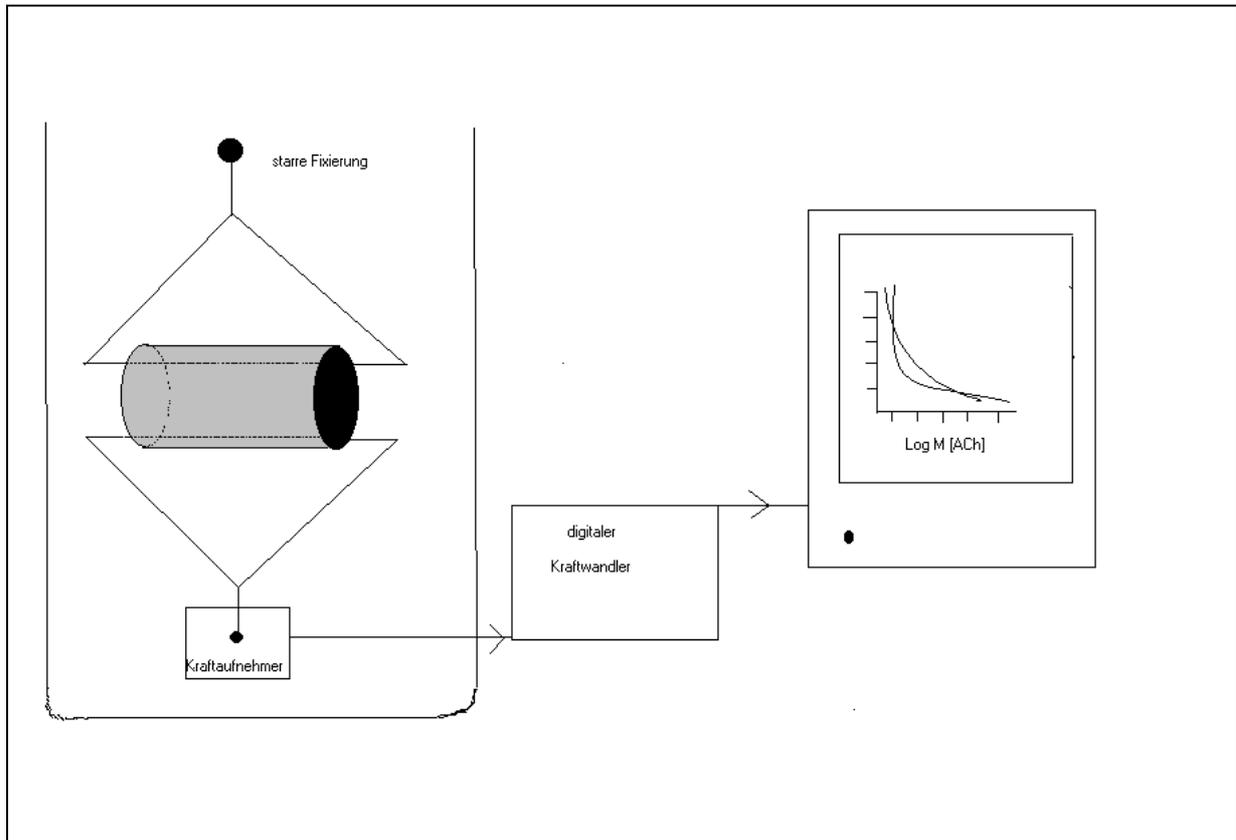
Durch eine Phenylephrintitration wurden die Ringe auf einen Tonus von 40 bis 50% des KCl-Maximaltonus vorkonstruiert.

Durch kumulative Zugabe von Acetylcholin (Sigma; 1 nmol - 3 µmol) und Nitroglycerin (Pohl Boskamp; 1 nmol - 30 µmol) in halblogarithmischen Einheiten konnte die endothelabhängige und -unabhängige Vasodilatation gemessen werden.

Die den jeweiligen Dosen entsprechenden Vasodilatationen wurden als Prozentwerte der maximalen Phenylephrin-Antwort berechnet.

Nach einer weiteren Inkubation mit 80 mmol KCl bis zur Maximalkonstriktion und anschließenden Waschschritten, wurden die vasokonstriktorischen Antworten von in

halblogarithmischen Schritten kumulativ zugegebenem Phenylephrin (Sigma; 10 nmol - 30  $\mu$ mol) gemessen.



**Abbildung 5:** Messprinzip der Organbadanlage<sup>4</sup>

Die den jeweiligen Dosen entsprechenden Vasodilatationen wurden als Prozentwerte der maximalen Phenylephrin-Antwort berechnet. Nach einer weiteren Inkubation mit 80mmol KCl bis zur Maximalkonstriktion und anschließenden Waschschritten, wurden die vasokonstriktorischen Antworten von in halblogarithmischen Schritten kumulativ zugegebenem Phenylephrin (Sigma; 10 nmol - 30  $\mu$ mol) gemessen.

<sup>4</sup> Der Aortenring ist durch feine Drähte mit dem Kraftwandler verbunden. So kann jede Veränderung der Gefssweite bzw. –Spannung registriert werden. Die so gewonnenen Daten werden per EDV weiterverarbeitet. Eigene Darstellung

## **2.4 Messung der Superoxidationenproduktion in intakten Gefäßsegmenten mit Hilfe der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz**

Als Detektor für die vaskuläre Produktion von  $O_2^-$  wurde die Lucigenin verstärkte Chemilumineszenz mit einer Endkonzentration von  $5 \mu\text{mol/l}$  verwendet (validiert von Skatchkov et al 1999). Diese Reaktion besteht aus 3 Schritten: Als erstes wird aus Lucigenin (bis-N-methylacridinium-Nitrat) unter Abgabe eines Elektrons  $e^-$  ein positiv geladenes Kation.

Dieses reagiert dann mit einem Superoxidation, es entsteht als Intermediärprodukt Lucigenindioxetan, das aber unbeständig ist und sehr schnell zu N-methylacridon reagiert und dabei ein Photon freisetzt. Der Chemilumineszenz-Counter Beckman LS-1801 detektiert bei dieser Reaktion einen freigesetzten Lichtblitz.

Die Spezifität des Lucigenin-Assays für  $O_2^-$  ist sehr hoch, wie Ohara et al. 1993 nachweisen konnten, andere reaktive Radikale erzeugten nahezu kein Signal.

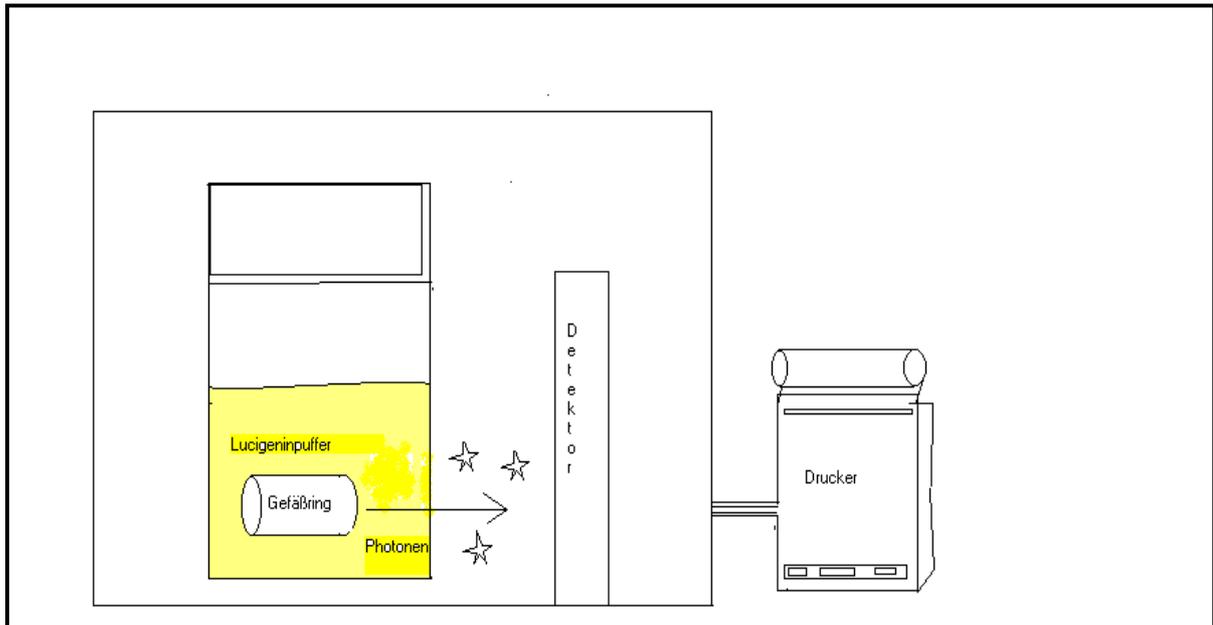
Die Endkonzentration vom Lucigenin von  $5 \mu\text{mol}$  wurde bewusst niedrig gewählt, um die durch Lucigenin selbst verursachte Superoxidproduktion vernachlässigen zu können (Skatchkov et al. 1999).

Die bei der Reaktion zwischen Superoxidationen und Lucigenin gebildeten Lichtquanten ( $h\nu$ ) wurden vom Chemilumineszenzdetektor als CPM (counts per minute) erfasst und über einen angeschlossenen Drucker aufgezeichnet.

Vor Versuchsbeginn wurden die zu messenden Proben 30 min bei 37 Grad Celsius im Wasserbad (Fissons HS 89100) erwärmt. Parallel zu den Versuchen am Counter wurden die Ringe im Organbad mittels einer ACh-Dosiswirkungskurve auf die Funktionsfähigkeit ihres Endothels überprüft.

Es wurde stets versucht, die Versuchsbedingungen so konstant wie möglich zu halten, um eine Veränderung der Versuchsergebnisse durch exogene Faktoren zu vermeiden.

Ein Glasszintillationsgefäß wurde mit  $700\mu\text{l}$  einer Lösung aus Krebs-HEPES-Puffer und Lucigenin (bis-N-methylacridinium-Nitrat) in einer Endkonzentration von  $5 \mu\text{mol}$  befüllt. Anschließend wurde es für mindestens 15 min dunkel gelagert, da es unter Lichteinwirkung zu einer Erhöhung des Chemilumineszenzsignals kommt.



**Abbildung 6:** Aufbau des Beckman-Counters<sup>5</sup>

Dann wurde es im Chemilumineszenzcounter (Beckman LS1801) in Intervallen von 60s gemessen bis sich ein stabiles Chemilumineszenz-Plateau aufgebaut hatte. Als Messmodus wurde der sogenannte „out-of-coincidence“ Modus eingestellt.

Der so gefundene Wert wurde von den in den nachfolgenden Messungen gefundenen Werten subtrahiert. So konnte am Ende der Untersuchung ein Nullwert bzw. ein Grundrauschen von den Meßwerten abgezogen werden.

Nach der Equilibrationsphase wurden die Gefäßproben in das Meßgefäß im Counter gelegt und über einen Zeitraum von 15 Minuten minütlich gemessen. Nach den Messungen wurden die Präparate für 24 Stunden in einem 90 Grad Celsius warmen Trockenschrank aufbewahrt.

Um die Meßdaten als Counts pro Milligramm je Zeiteinheit (Counts/mg/min) ausdrücken zu können, wurden die Gefäßringe nach der Trocknungszeit mit einer Präzisionswaage (Mettler H51; Kleinstwert der Fehlergrenze 0,05 mg) gewogen.

Bei einem Teil der Gefäßproben wurde während der Inkubationszeit für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius der NOS-Hemmstoff N-Methyl-L-Arginin (L-NMMA; Sigma; 1 mmol) hinzugefügt, um die Rolle der endothelialen NO-Synthase (eNOS oder NOS III) auf das vaskuläre Chemilumineszenzsignal zu ermitteln.

<sup>5</sup> Der Gefäßring schwimmt in dem mit Lucigenin angereicherten KH-Puffer. Die gebildeten Superoxidationen reagieren mit dem Lucigenin unter Emission von Lichtquanten, die von einem Detektor registriert und verstärkt werden. Die CPM werden über einen angeschlossenen Drucker aufgezeichnet und dann per EDV weiterverarbeitet.

Die so gewonnenen Daten wurden im Tabellenkalkulationsprogramm „Microsoft Excel“ aufgenommen und weiterverarbeitet. Dabei wurde das Hintergrundsignal (Glasszintillationsgefäß alleine) von den einzelnen Meßwerten subtrahiert, um so die um Störsignale bereinigten counts pro Minute zu erhalten.

Als nächstes wurde aus dem Kollektiv der gewonnenen Ergebnisse der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

## **2.5 Bestimmung der P-VASP-Aktivität**

Die Bestimmung der P-VASP-Aktivität erfolgte mittels Immunoblottechnik in Anlehnung an Oelze (Oelze et al. 2000). Tiefgefrorene Gefäße wurden zunächst in flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben, in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes 2 ml Eppendorf-Reagiergefäß überführt und mit eiskalter Hg-Lösung (300 µl pro 100 mg Gewebe) durch leichtes Vortexen aufgetaut.

Anschließend wurde das Homogenat unter mehrmaligem Vortexen 1 Stunde auf Eis inkubiert, um mittels der in den Hg-Lösungen enthaltenen Detergenzien (Triton X-100 bzw. NP-40) die mit Membranen assoziierten Proteine aufzuschließen.

Darauf folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten mit 5000 g bei 4 Grad Celsius (Sigma, 12154-H), um unlösliches Material zu entfernen. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und ca. 20 µl für die Protein-Konzentrationsbestimmung abgenommen.

Im Anschluss daran erfolgten Elektrophorese und Elektroblotting unter der Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers (Verdünnung 1 µg/ml) gegen die phosphorylierte Form von VASP, dem P-VASP at phosphoserine 239. Zur Bestimmung der Gesamtkonzentration von VASP erfolgten Elektrophorese und Elektroblotting mit einem zweiten Antikörper gegen VASP.

Die Antikörperreaktionen wurden für 90 Minuten mit 1 % (w/v) Hämoglobin in Waschpuffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Intensität der VASP/P-VASP-Banden wurde mit derjenigen der Kontrollbande verglichen. Dies geschah durch densitometrische Bestimmungen mit Hilfe des Epson-Scanners GT-9600 (Durchlichtaufsatz Model EU-35) und des Programms ScanPack 3.0 (Biometra).

Nach Bradford (1976) wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays in Verbindung mit der jeweils verwendeten Hg-Lösung eine Eichkurve mit aufsteigenden, definierten

Proteinkonzentrationen (aus BSA-Stammlösung) erstellt (inkl. einer Leerprobe 10 Reagenzgläser, Proteingehalt von 0,5 bis 20 µg/ml).

Die zu messenden Proben wurden jeweils als Doppelbestimmung nach entsprechender Vorverdünnung (5 µl ad 800 µl H<sub>2</sub>O bidest.) ebenfalls in Reagenzgläser überführt. Nach Zugabe des Bio-Rad Reagenz (200 µl bei einem Gesamtvolumen von 1000 µl) wurden die Proben durch mehrmaliges Invertieren gemischt und nach 15 Minuten die Extinktion bei 595 nm Wellenlänge gemessen. Aus der Eichkurve wurde die Proteinkonzentrationen der Proben in µg/µl abgeleitet.

## **2.6 Bestimmung der Superoxidkonzentration mittels Dihydroethidinfärbung**

Die Gefäßsegmente wurden wie oben beschrieben auf Eis in 10 ml KP-Puffer gelagert. Dem Puffer wurde ein Gemisch der Proteaseinhibitoren Leukopeptin (0,1176 µmol), Pepstatin A (0,102 µmol) und Aprotinin (0,015 µmol) zugefügt.

Die Gefäßringe wurden zügig in TissueTec eingebettet und anschließend in Isopentan gebadet. Es wurden mit dem Cryostat Schnitte in der Dicke von 30 µm angefertigt, nachdem die Gefäßproben zuvor in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Diese wurden dann auf SuperFrost-Objektgläser gebracht und mit 10 µmol Dihydroethidin, das vorher in DMSO gelöst und dann mit PBS weiter verdünnt wurde, beschichtet.

Die so angefertigten Proben wurden daraufhin bei 37 Grad Celsius inkubiert.

Zur Bestimmung der lokalen Konzentration von Superoxid in den einzelnen Gefäßkompartimenten machte man sich die Eigenschaften von Dihydroethidin zunutze (Munzel et al. 2000). DHE reagiert mit Superoxid spezifisch zu Ethidium Bromid. Dieses lässt sich mit einem konfokalen Mikroskop quantitativ bestimmen.

## **2.7 Messung der PKC-Aktivität**

Die Bestimmung der PKC-Aktivität geschah in Anlehnung an Mollnau et al. 2001 unter Nutzung eines ELISA-Kits von Calbiochem. Die Gefäße wurden zunächst auf Eis homogenisiert und 3 mal für 10 Sekunden im Ultraschallbad bereinigt und anschließend für 10 min bei 2000 g abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde ähnlich wie unter 2.5 beschrieben mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt, die Proben wurden über Nacht bei 4 Grad Celsius gelagert. Die Messung der PKC-Aktivität in den Proben wurde unter Verwendung eines ELISA Kits von Calbiochem bestimmt. Dabei wurden 6 µg von

Proteinprobe einem Puffergemisch (25 mmol/L Tris-HCL, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol/L ATP, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> und 50µg/ml Phosphatidylserin) beigegeben. Für die Negativkontrolle wurde das Phosphatidylserin gegen 20 mmol/L EGTA ausgetauscht sowie das CaCl<sub>2</sub> weggelassen. Zur Inhibierung der PKA-Aktivität wurde ein PKA-Inhibitor in einer Konzentration von 80nmol/L dem Puffer beigelegt. Die Proben wurden abschließend in einer 96-Well-Platte, die mit Pseudosubstrat beschichtet war, aufgetragen. Bei Vorliegen von PKC in der Probe kommt es nach dem Auftragen zur Phosphorylierung mit dem Pseudosubstrat am Serin. Die Reaktion eines speziellen Peroxidase-gekoppelter Antikörpers mit dem phosphorylierten Pseudosubstrat stellte eine Farbreaktion dar, die sich photometrisch bei 492nm quantifizieren liess.

## **2.8 Messung der Blutdruckwerte**

Sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den hypertensiven Ratten wurden die systolischen Blutdruckwerte vor Implantation der Wirkstoffpumpen am Schwanz bestimmt. Dies geschah mit dem TSE Blood Pressure Monitor (TSE Systems, 209002 Series). Hierzu wurde um den Rattenschwanz eine Manschette gelegt, deren Luftdruck durch eine Pumpe stufenlos veränderbar ist. Körperfern dieser Manschette wurde eine zweite Manschette angelegt, in die ein Fotosensor eingebaut ist, der die von einer LED ausgestrahlte Lichtenergie misst. Die blutdruckabhängigen, pulsatilen Veränderungen des Durchmessers der Arterie führen zu Veränderungen der Lichttransmission, die durch den Sensor erfasst und in ein elektrisches Signal gewandelt werden. Der Druck in dieser Manschette wurde soweit erhöht, bis keine pulsatilen Veränderungen mehr erfasst werden konnten. Dieser Druck wurde dann als systolischer Blutdruck aufgezeichnet. An den Folgetagen wurden die Blutdruckwerte ebenfalls einmal täglich erfasst.

## **3. Auswertung**

### **3.1 Datenerfassung und Datenverarbeitung**

Die wie oben beschrieben gewonnenen Daten wurden im Tabellenkalkulationsprogramm „Microsoft Excel“ aufgenommen und weiterverarbeitet. Dabei wurde das Hintergrundsignal (Glasszintillationsgefäß alleine) von den einzelnen Messwerten subtrahiert, um so die um Störsignale bereinigten counts pro Minute zu erhalten.

Die Tabellen und Graphen wurden mit Hilfe der Programme MS Excel 5.0, Cricket Graph, MS PowerPoint und ScanPack 3.0 erstellt. Zur Textverarbeitung ist das Programm MS Word verwendet worden. Die kardiologische Arbeitsgruppe ist im Besitz der notwendigen Lizenz für diese Programme. Als Hardware wurden Power PCs der Firma Apple benutzt.

### **3.2 Datenanalyse und statistische Methoden**

Von allen Messwerten wurde die Standardabweichung sowie der Fehler des Mittelwertes ( $=\text{StDev (Standardabweichung)} / \text{Wurzel (n=Stichprobengröße)} = \text{SEM}$ ) bestimmt. Die im Ergebnisteil dargestellten Daten stellen den arithmetischen Mittelwert dar, der mit dem „standard error of the mean“ (SEM) dargestellt wurde. Zur Berechnung der ED<sub>50</sub>-Werte der Organbadexperimente wurde die logarithmische Transformation benutzt.

Für die Vergleiche innerhalb der Behandlungsgruppen (ED<sub>50</sub>-Werte, maximale prozentuale Relaxation und Konstriktion, Superoxidanionenproduktion) wurde der ungepaarte ANOVA-Test verwendet.

Um die Signifikanz zu testen, wurde bei Stichproben mit unterschiedlicher Varianz der Student-T-Test durchgeführt. Von einer Signifikanz konnte bei  $p < 0,05$  ausgegangen werden.

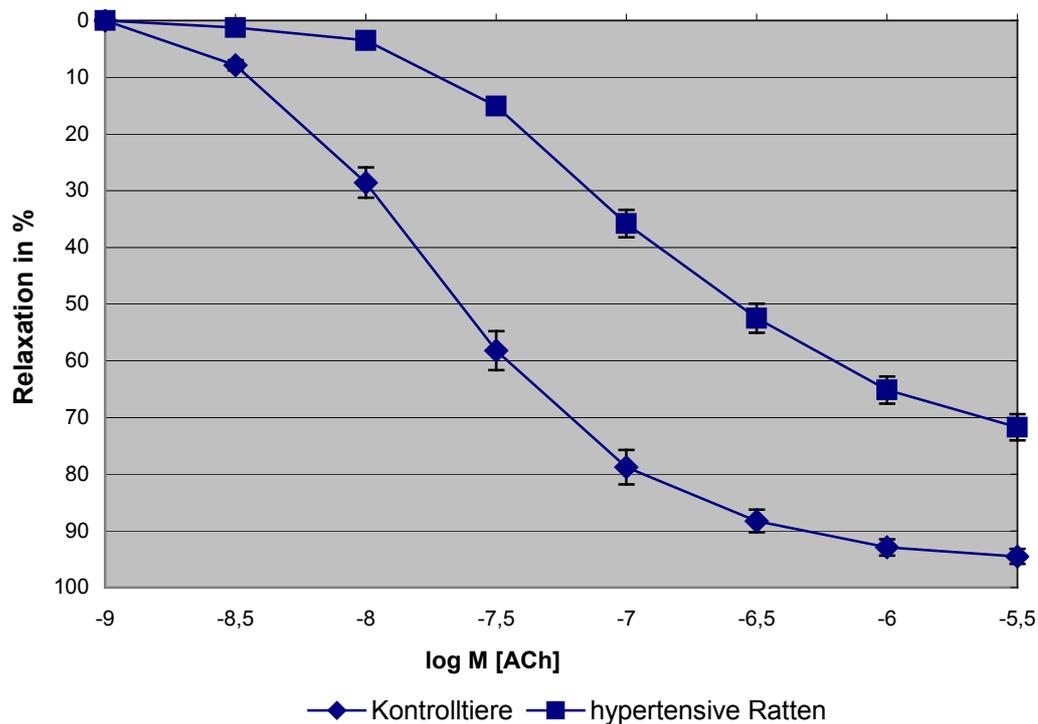
## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Ergebnisse der Messungen in der Organbadanlage**

#### **4.1.1 Effekte der Angiotensin II-Gabe auf die endothelabhängige Vasorelaxation durch Ach**

ACh ist ein endothelabhängiger Vasodilatator und führt über den NO-Pathway zu einer Relaxation der glatten Muskulatur.

In den mit Ach durchgeführten DWK's zeigte sich bei den Versuchen mit Aorten von Kontrolltieren (KTR) eine dosisabhängige Relaxation von maximal 94,5 % mit einer ED<sub>50</sub> von 7,6 (-log M, n=42). Die Behandlung mit ATII hingegen führte zu einer deutlichen Abschwächung dieses vasodilatatorischen Effektes in Sinne einer endothelialen Dysfunktion.



**Abbildung 7:** Endothelabhängige Vasodilatation durch Acetylcholin (ACh) bei Kontrolltieren und mit ATII behandelten Tieren

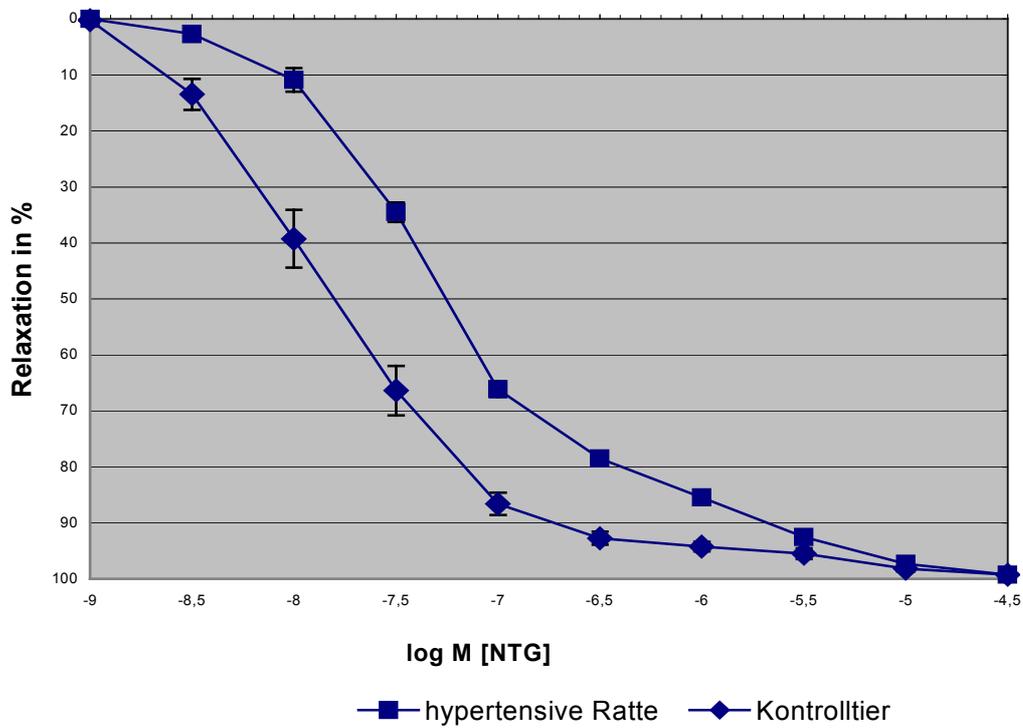
Die Sensitivität, welche durch die ED<sub>50</sub> von 6,55 (-log M, n=82). ausgedrückt wird und die maximale Relaxation (71,70 %) waren hierbei im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich reduziert.

#### 4.1.2 Effekte der Angiotensin II-Gabe auf die endothelunabhängige Vasorelaxation durch Nitroglyzerin

Bei den Versuchen mit dem endothelunabhängigen Vasodilatator Nitroglyzerin (NTG) bei Kontrollgefäßen und jenen mit ATII behandelten Gefäßen lag die maximale Relaxation gleichermaßen bei 99,2 %.

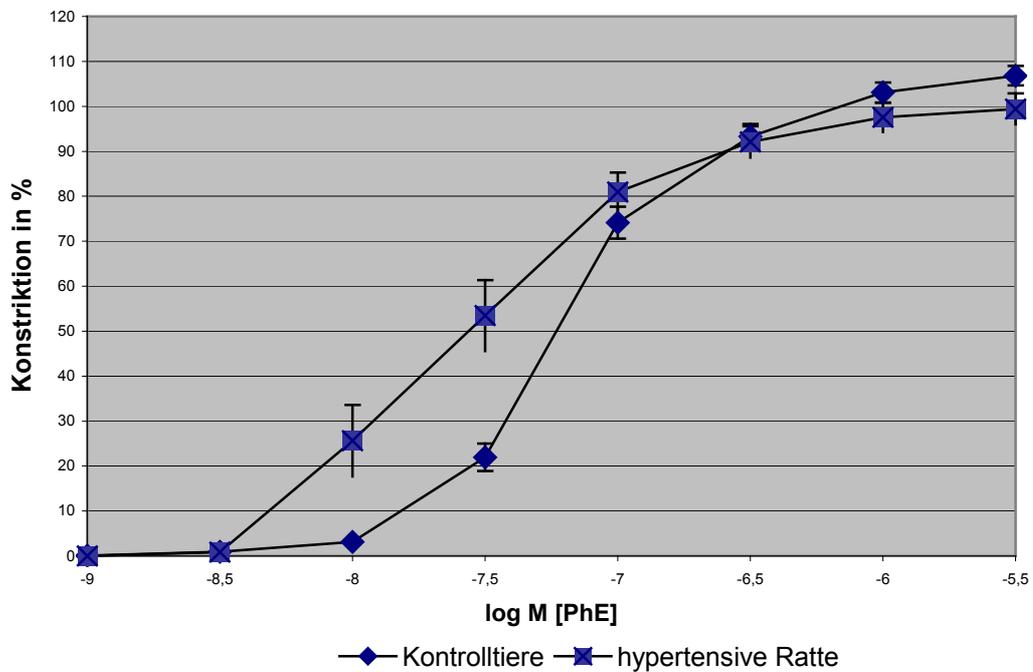
Die durch die ED<sub>50</sub> ausgedrückte Sensitivität lag nach Angiotensininfusion allerdings mit 7,25 (-log M, n=19) wesentlich niedriger als bei den Kontrolltieren mit 7,8 (-log M, n=19).

Ähnlich wie bei den Untersuchungen mit ACh zeigten sich auch bei den Versuchen mit NTG eine Rechtsverschiebung der DWK gegenüber der Gruppe der Kontrolltiere im Sinne einer herabgesetzten Antwort auf Vasodilatoren, was einer Verschlechterung der Endothelfunktion entspricht.



**Abbildung 8:** Endothelunabhängige Vasorelaxation durch Nitroglycerin (NTG) bei Kontrolltieren und unter ATII-Infusion

#### 4.1.3 PhE-vermittelte Vasokonstriktion



**Abbildung 9:** Vasokonstriktion unter Stimulation mittels PhE

In dieser Versuchsreihe sollte das Ansprechverhalten sowie die maximale Vasokonstriktion bei Kontrollgefäßen und jenen mit ATII behandelten Gefäßen unter dem Vasokonstriktor Phenylephrin (PhE) gemessen werden.

Die maximale Vasokonstriktion beträgt bei den Kontrolltieren 113,8 %, bei den hypertensiven Tieren 103,8 %. Hier zeigt sich, dass die maximale Konstriktion bei den hypertensiven Tieren ebenfalls herabgesetzt ist.

## 4.2 Ergebnisse der Radikal-Messungen mittels Lucigeninverstärker

### Chemilumineszenz

Mittels der Lucigeninverstärkten Chemilumineszenz wurde die Superoxidproduktion von Kontrollratten mit der von ATII behandelten Tieren verglichen. Hier zeigte sich, dass die Superoxidproduktion in Aortenringen von ATII-behandelten Tieren um 386 % höher lag als die von den Kontrolltieren. Die Superoxidproduktion konnte bei den hypertensiven Tieren durch Deendothelialisierung um 34,6 % verringert werden. Ebenso konnte die Superoxidproduktion durch Gabe des NOS-Inhibitors LNNA um 44,5 % verringert werden.

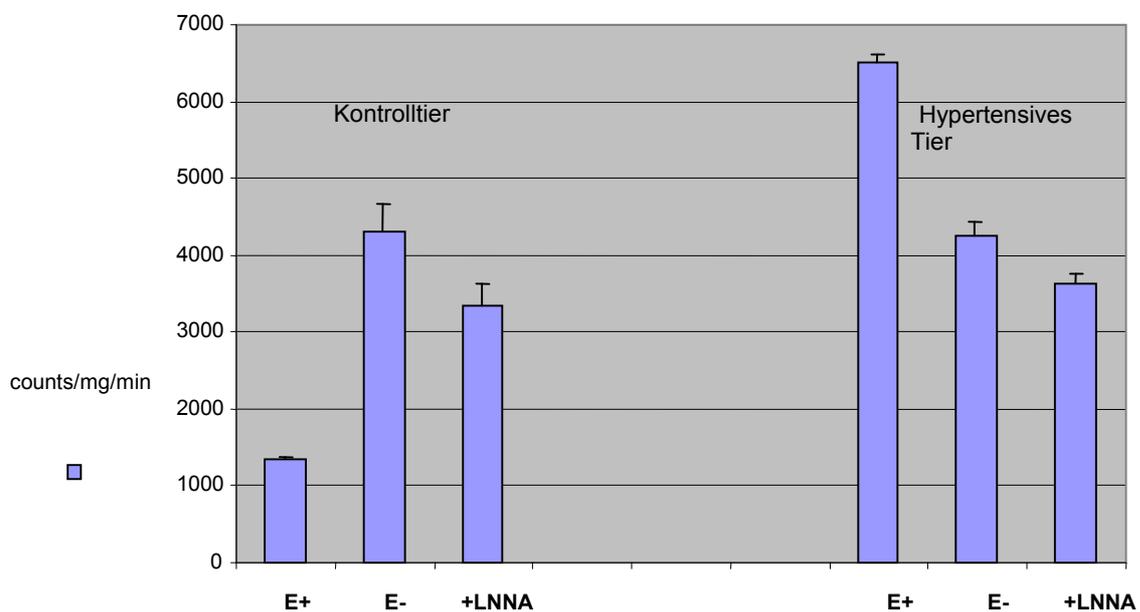


Abbildung 10: Ergebnisse der Radikal-Messungen

Im Gegensatz dazu stieg die Superoxidproduktion bei den Kontrolltieren nach Deendothelialisierung um 222,3% an. Auch eine Blockade der NOS mit LNNA hatte einen ähnlichen Effekt. Hier stieg die Produktion um 150,2% an.

### 4.3 Ergebnisse der VASP-Messung

Im Rahmen der Bestimmung der P-VASP-Aktivität wurden mittels Immunoblot quantitative Vergleiche des durch die cGK phosphoryliertem, sogenanntem P-VASP angestellt. Hier zeigte sich bei quantitativ gleicher Expression des Gesamt-VASP unter den verschiedenen Versuchsgruppen, dass der Anteil des VASP in seiner aktiven, also phosphorylierten Form bei den hypertensiven Tieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf 40 % abgesunken war.

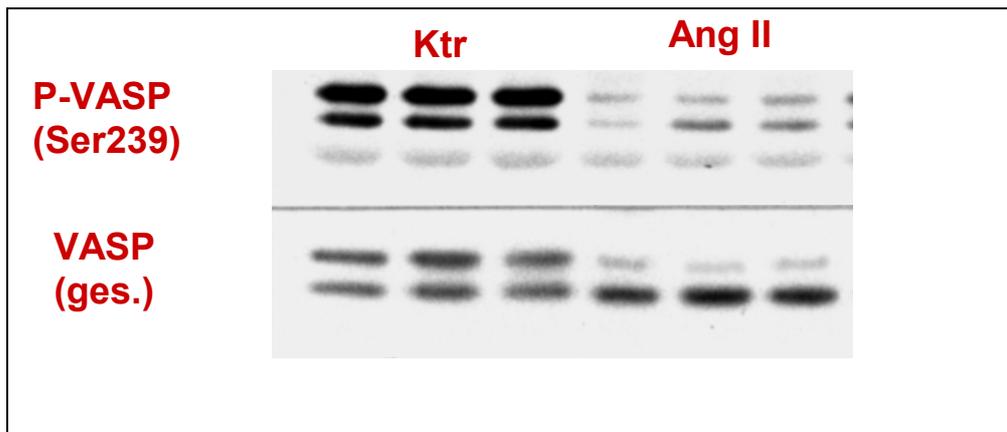


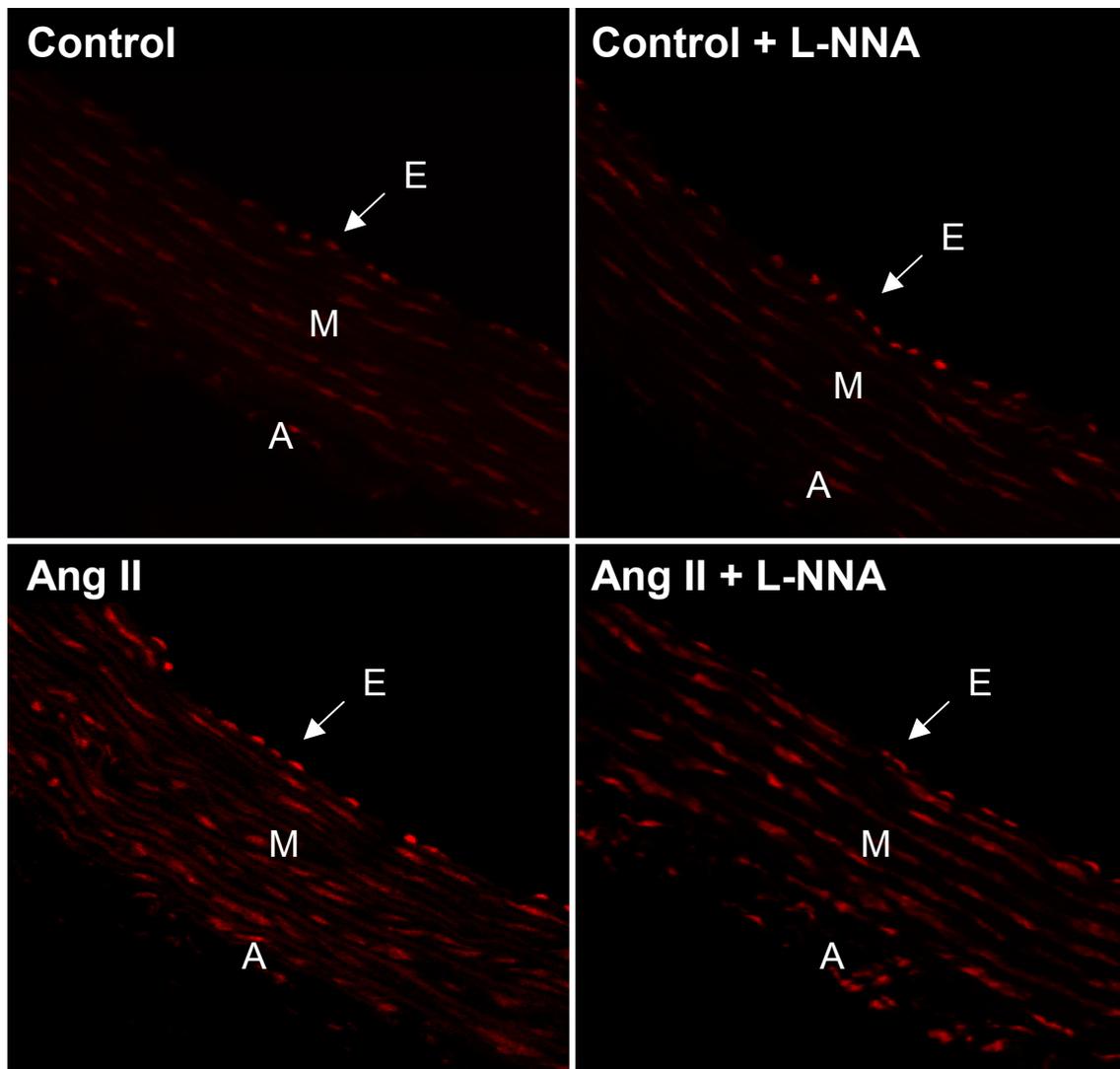
Abbildung 11: Darstellung der VASP/P-VASP-Aktivität mittels Immunoblot

### 4.4 Ergebnisse der Dihydroethidinanfärbung

Mit Hilfe der Dihydroethidinanfärbung sollte bestimmt werden, in welchen Gefäßschichten es zu einer Steigerung der Radikalbildung unter Stressbedingungen kommt sowie ob diese durch Blockade der NAD(P)H-Oxidase durch Chelerythrin reversibel ist.

Nach Anfärbung der Gefäßquerschnitte mit DHE zeigte sich hier bei den hypertensiven Tieren eine deutliche Zunahme der Superoxidproduktion sowohl im Endothel als auch in der glatten Muskulatur.

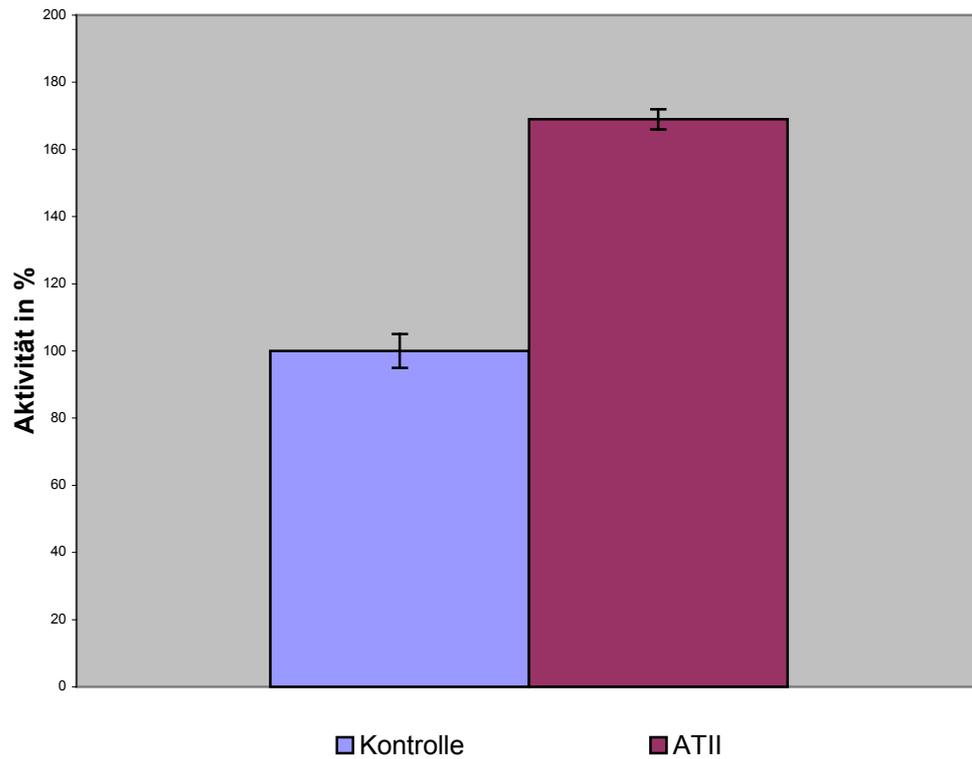
Nach Hemmung der PKC durch Chelerythrin kam es im Endothel, aber auch im Bereich der glatten Muskulatur zu einem Abfall der Superoxidproduktion.



**Abbildung 12:** Superoxidanfärbung mittels DHE

#### 4.5 Ergebnisse der PKC-Bestimmungen

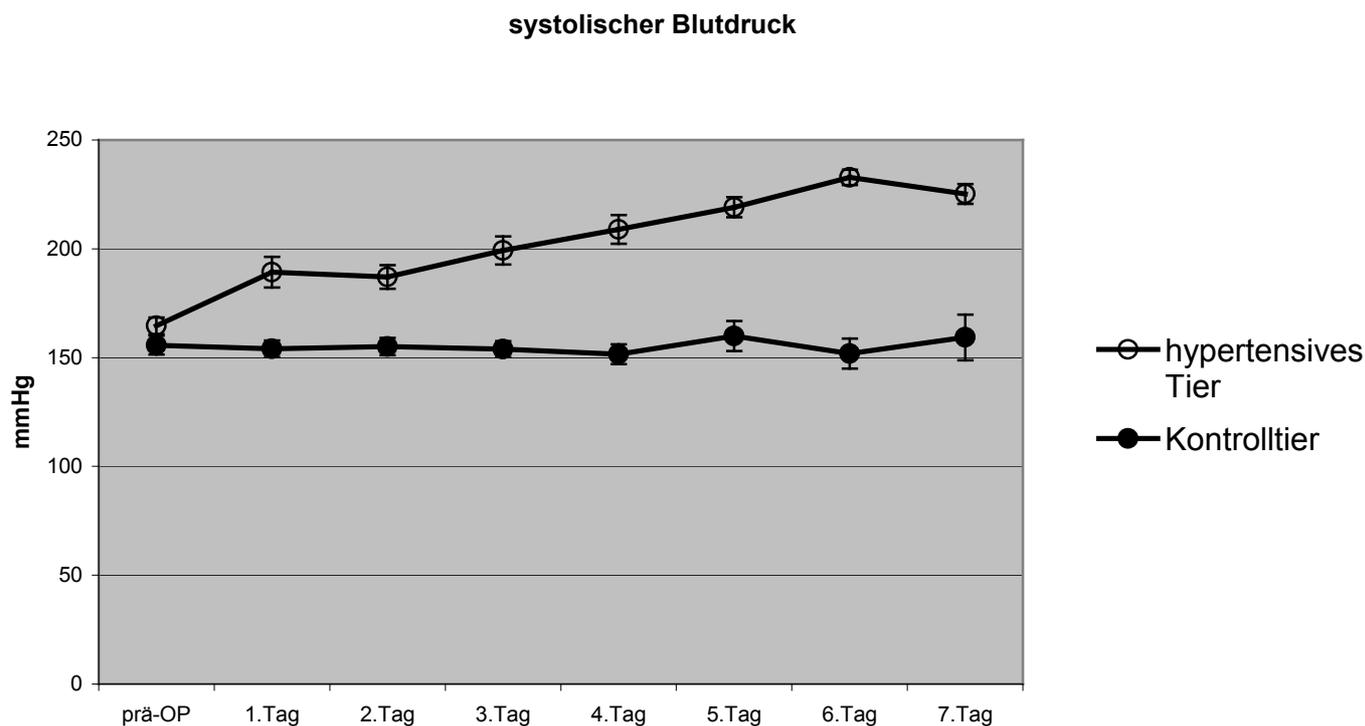
Die PKC spielt bei der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidasen eine entscheidende Rolle. Durch ihre Aktivitätsbestimmung lassen sich Rückschlüsse über die ATII- vermittelte Superoxidbildung bestimmen. Bei den Untersuchungen zeigte sich eine Steigerung der PKC-Aktivität der hypertensiven Tieren um 69% im Vergleich zu den Kontrolltieren.



**Abbildung 13:** PKC-Aktivität

#### **4.6 Ergebnisse der Blutdruckmessungen**

Im Rahmen der Blutdruckmessungen konnte ein signifikanter Anstieg der systolischen Blutdruckwerte der hypertensiven Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet werden. Der systolische Blutdruck stieg bei den hypertensiven Tieren im Laufe von 7 Tagen von 164 mmHG auf 225 mmHG an, dies entspricht einer Steigerung von 37,1 Prozent.



**Abb. 14 :** Veränderung des Blutdruckes

## 5. Diskussion

### 5.1 Effekte einer Angiotensin II Behandlung auf die Endothelfunktion

Eine ATII Behandlung für einen Zeitraum von 7 Tagen führte zu einer deutlichen endothelialen Dysfunktion, die an einer Verschiebung der Acetylcholin vermittelten Vasodilatation abgelesen werden kann. Diese Ergebnisse entsprechen somit der von Rajagopalan et al. publizierten Arbeit, in der ein ähnliches Verhalten der Gefäße ATII behandelte Tiere nachgewiesen werden konnte (Rajagopalan et al 1996). Als Endothel-unabhängiger, NO-abhängiger Vasodilatator setzten wir Nitroglyzerin ein und es zeigte sich auch hier eine deutliche Abschwächung der Nitratsensitivität. Eine Abschwächung der Wirkung von ACh und gleichzeitig der Wirkung von NTG könnte auf einer vermehrte vaskuläre Superoxidbildung hinweisen, da bei beiden Substanzen die Vasodilatation in erster Linie über eine vermehrte NO Bildung mediiert ist.

## **5.2 Effekte von ATII auf die vaskuläre Superoxidproduktion**

Die vorliegenden Daten belegen in der Tat, dass es unter ATII-vermittelter Hypertension zu einem Anstieg der vaskulären Superoxidproduktion kommt. Diese ist zumindest teilweise PKC-abhängig. ATII führt weiterhin zu einer Entkopplung der NO-Synthase. Dieses Phänomen verstärkt den ohnehin schon bestehenden oxidativen Stress in den untersuchten Gefäßen. Obwohl es zu einer vermehrten Expression der NOS kommt zeigte sich die Bioverfügbarkeit von NO als herabgesetzt (Mollnau et al. 2002). Dies wurde durch Aktivitätsmessungen der cGK-I bestätigt, die Phosphorylierung von VASP zeigte sich als deutlich reduziert.

Wie auch schon durch Rajagopalan et al. gezeigt, kommt es zu einer Verschlechterung des Ansprechverhaltens von AngiotensinII-infundierten Gefäßen gegenüber endothelabhängigen Vasodilatoren (Rajagopalan et al. 1996). Hierfür wurde eine gesteigerte Aktivität der NAD(P)H-Oxidase verantwortlich gemacht. Unter Verwendung einer liposomalen SOD konnte eine Funktionsverbesserung der Endothelfunktion nachgewiesen werden (Fukui et al. 1997).

Diese Beobachtungen sprechen eindeutig für eine Superoxid-abhängige Inaktivierung von NO und eine daraus resultierende endotheliale Dysfunktion. Eine wie oben beschrieben durchgeführte PKC-Aktivitätsbestimmung zeigte einen Anstieg der PKC-Aktivität auf das Doppelte in Gefäßhomogenaten hypertensiver Tiere im Vergleich zu denen von Kontrolltieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es unter Behandlung der Gefäße mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin zu einem deutlichen Rückgang des Superoxidanfalls unter Anfärbung mittels Dihydroethidin bei den hypertensiven Tieren kam. Durch Superoxidmessungen mittels Lucigenin konnte dies bestätigt werden. Dies legt nahe, dass die Aktivität superoxidproduzierender Enzyme wie z.B. der NADPH-Oxidase stark von der vaskulären PKC-Aktivität abhängt.

## **5.3 Effekte von ATII auf die NO- sowie Superoxidproduktion durch die NOS**

Es wurde bereits gezeigt, dass von NAD(P)H-Oxidasen stammendes Superoxid unter diabetischer Stoffwechsellage zu einer Entkopplung der NOS führen kann (Hink et al. 2001). Die in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche lassen ähnliche Rückschlüsse zu. Es zeigte sich eine Steigerung der Expression der NOS III, die NO-

Produktion zeigte sich jedoch vermindert (Mollnau et al. 2001). Wir konnten weiterhin beobachten, dass die Superoxidproduktion der verschiedenen Gruppen sich deutlich unterschieden: Die hypertensiven Tiere wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine um 387% höhere Superoxidproduktion auf, diese ließ sich interessanterweise durch die Behandlung mit dem NO-Synthase-Hemmer LNNA drastisch reduzieren.

Im Gegensatz zu den hypertensiven Tieren stieg bei den Kontrolltieren die Superoxidproduktion nach Gabe des NO-Synthase-Hemmers LNNA allerdings stark an. Dies wiederum bedeutet, dass ein beträchtlicher Teil der basalen Superoxidproduktion durch die Interaktion mit NO, vermutlich unter der Bildung von Peroxynitrit gequencht wird.

Während die Blockade der NOS unter normotensiven Bedingungen zu einem Superoxidanstieg führte, kam es unter hypertensiven Bedingungen zu einem Abfall der Superoxidproduktion, was als Beweis für eine Entkopplung der NO-Synthase angesehen werden kann.

Die Verantwortlichkeit von AT II für die vermehrte Radikalbildung zeigte auch die Arbeit von Warnholtz et al., bei hypercholesterinämischen Tieren konnte durch die Gabe eine AT<sub>1</sub>-Blockers die vermehrte Radikalbildung in den Gefäßen, aber auch die Atheroskleroseentwicklung drastisch reduziert werden (Warnholtz et al. 1999).

#### **5.4 Dihydroethidinfärbung**

Nach Anfärbung von Gefäßpräparaten mit DHE zeigte sich ein unterschiedliches Anfärbungsprofil der Präparate der Kontrolltiere im Vergleich zu denen der hypertensiven Tiere. Es zeigt sich bei den hypertensiven Tieren ein starker Superoxidanstieg in allen Gefäßschichten.

Inkubation mit LNNA bewirkte bei den Kontrolltieren einen Anstieg der Superoxidproduktion im Endothel, während es bei den hypertensiven Tieren zu einem Superoxidabfall im Bereich des Endothels führte, was ebenfalls mit einer weiteren Methode den Beweis einer eNOS Entkopplung erbrachte.

Die hier gewonnenen Ergebnisse stehen somit in Konkordanz mit den Ergebnissen aus der unter 5.2 beschriebenen Superoxidmessung.

## 5.5 Effekte der ATII-Gabe auf den NO-Pathway

Eine Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit durch Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen und/oder NOS-Entkopplung würde wie weiter oben beschrieben zu einer Aktivitätsminderung im NO-Pathway führen. Um dies in den Gefäßen quantifizieren zu können, griffen wir auf die Methode der Quantifizierung des sogenannten Vasodilator Stimulated Phosphoprotein zurück (Smolenski et al. 1998). Die cGMP abhängige Kinase phosphoryliert VASP bevorzugt an der Stelle 239, wie konnten in früheren Untersuchungen zeigen, dass dieser Marker exzellent die vaskuläre NO Bioverfügbarkeit reflektiert. P-VASP war reduziert in Gefäßen von atherosklerotischen und in nitratoleranten Gefäßen bei denen ebenfalls eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion nachzuweisen war. Dies konnte auch mit den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden. Die Angiotensin II induzierte endotheliale Dysfunktion und die verminderte NO-Bildung zusammen mit der gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führte zu einer drastischen Reduktion von P-VASP in den Gefäßen der Angiotensin II behandelten Tiere.

Dies spricht bei gleichzeitig erhöhter Expression der NOS (Mollnau et al. 2001) für eine Störung im NO-Pathway. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse aus den Organbaduntersuchungen (5.4) bei denen eine verminderte endothelabhängige Relaxation nachgewiesen werden konnte.

## 5.6 Organbaduntersuchungen

In den Organbaduntersuchungen konnte eine Abschwächung der maximalen Relaxation unter Gabe der Vasodilatoren NTG und vor allem ACh bei den hypertensiven Tieren beobachtet werden.

Eine Erklärung hierfür könnte eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO an den glatten Muskelzellen sein, der zur Relaxation führende Mechanismus konnte nicht mehr vollständig ausgelöst werden.

Hier ist es schwierig zu unterscheiden, ob es zu einer vorzeitigen Inaktivierung des NO durch Superoxidradikale kommt oder ob die Bildung von NO generell reduziert ist. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die NOS-Expression unter hypertensiven Bedingungen zwar erhöht sein kann, allerdings in ihrer Funktionsweise gestört zu sein scheint (Mollnau et al. 2002, Fukui et al. 1997). Verantwortlich für die erhöhte Expression der NO-Synthase scheint in erster Linie das Dismutationsprodukt von  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  zu sein, das nachweislich die

Expression von eNOS auf transkriptioneller und translationeller Ebene steigern kann (Drummond et al. 2000).

### **5.7 Bedeutung der PKC-abhängigen Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen als radikalbildendes System**

Verschiedene Studien haben belegt, dass das bei Aktivierung des RAAS-Systems freigesetzte ATII sowohl in vivo als auch in vitro eine Steigerung der Superoxid-Bildungsrate zur Folge hat (Griendling et al. 1994), als deren Quelle die vaskulären NAD(P)H-Oxidasen gefunden wurden (Fukui et al. 1997).

Diese sind vor allem im glatten Muskel, aber auch im Endothel und in der Adventitia lokalisiert (Griendling et al. 1995, Rajagopalan et al. 1996) und lassen sich unter anderem von der Proteinkinase C aktivieren (Li et al. 1998).

Bei der Bestimmung der PKC-Aktivität fiel auf, dass diese unter hypertensiven Bedingungen um über 60% erhöht war.

In unserem Modell konnte gezeigt werden, dass ATII über einen PKC-vermittelten Mechanismus zu einer Aktivierung der NAD(P)H-Oxidasen beiträgt.

In Verbindung mit den in den anderen Versuchen erhobenen Daten konnte gezeigt werden, dass es unter den Versuchsbedingungen zu einem Superoxidanstieg kam, der durch ATII verursacht und durch die PKC vermittelt wurde.

Dieses führt zu Störungen im NO-Signalweg, was die verminderte NO-Verfügbarkeit noch verstärken kann und zur Entkopplung der NOS beiträgt. Die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidasen konnte über den PKC-Inhibitor Chelerythrin verhindert werden.

### **5.8 Anteil des Endothels an der Superoxidgeneration**

Um die endotheliale Superoxidproduktion von der Gesamtproduktion innerhalb des Gefäßes abgrenzen zu können, wurden sowohl bei den Kontroll- als auch bei den hypertensiven Tieren die Gefäßringe deendothelialisiert.

Es konnte durch Deendothelialisierung gezeigt werden, dass das Endothel bei hypertensiven Tieren einen entscheidenden Einfluß auf die Superoxidproduktion hat, die Superoxidproduktion sank nach Entfernung des Endothels deutlich ab.

Dies ließ sich auch nach Gabe des NOS-Inhibitors LNNA zeigen, was darauf schließen lässt, dass die endotheliale NOS für die Superoxidproduktion mitverantwortlich ist.

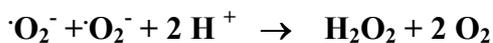
Bei Kontrolltieren zeigte sich das Gegenteil, nach Inhibition der NOS durch LNNA stieg die Superoxidproduktion bei den Chemilumineszenzmessungen an. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch die verminderte NO-Freisetzung weniger Superoxid inaktiviert wird und dessen Bioverfügbarkeit damit steigt.

Auch in den Gefäßanfärbungen mit DHE konnte eine vermehrte Superoxidbildung bei den hypertensiven Tieren im Endothel, in der Media und in der Adventitia nachvollzogen werden, der Anstieg zeigte sich unter der Gabe des PKC-Inhibitors Chelerythrin als reversibel, was die These unterstützt, dass die NAD(P)H-Oxidasen Quelle der Superoxidentstehung sind.

### **5.9 Mögliche Ursachen einer quantitativen Störung des Superoxid-Nachweises**

Bei der vergleichenden Messung des Superoxids kann es zu einer Verfälschung der Ergebnisse durch Spontandismutation der  $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale kommen, die Dismutation ist pH-Wert-abhängig.

Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) hat die Aufgabe, intrazelluläres Superoxid abzubauen, es katalysiert die Reaktion von Superoxid zu Wasserstoffperoxid :



Diese Reaktion verläuft schneller als die oben beschriebene Spontandismutation und beeinflusst die intrazelluläre Superoxidreaktion stärker als die Spontandismutation ( Babior et al. 2000).

Es gibt es Hinweise, dass die Konzentration der SOD sich verändern kann : Fukai et. al. zeigten 1999, dass bei hypertensiven Mäusen die SOD-Aktivität erhöht war, von Laursen konnte 1997 gezeigt werden, dass es unter Gabe von SOD zu einer Senkung der Superoxidproduktion bei hypertensiven Mäusen kam, auch deren Blutdruck normalisierte sich (Laursen et al. 1997).

### **5.10 Zusammenfassung und klinische Aspekte**

Dem endothelialen  $\cdot\text{NO}$ -Aufkommen kommt eine entscheidende Rolle bei der Regulation vieler Funktionen wie z.B. der Kontrolle der lokalen Wandspannung über Freisetzung von vasodilatatorisch wirksamen Substanzen wie  $\cdot\text{NO}$  und Prostacyclin, der Proliferation glatter Muskelzellen und der Plättchenaggregation zu.

Die vaskuläre Superoxidproduktion und Interaktion mit  $\cdot\text{NO}$  spielt eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie vieler Krankheitsprozesse des Gefäßsystems.

Es ist bekannt, dass ATII eine Endotheldysfunktion hervorruft, diese wird unter anderem durch eine von NAD(P)H-Oxidasen verursachte Superoxidproduktion erklärt. Inwiefern die NO-Synthase zur gesteigerten Superoxidproduktion beiträgt, ist aber noch weitgehend ungeklärt.

Mit der vorliegenden Studie sollte näher untersucht werden, zu welchen Veränderungen es bei experimentell induziertem arteriellem Hypertonus im vaskulären System kommt, und inwiefern die NO-Synthase zu diesen Veränderungen beiträgt.

Mit unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass es zu einem signifikanten Anstieg der Superoxidproduktion kam. Der Superoxid-Anstieg ließ sich jedoch durch Gabe von LNNA hemmen, dies wurde als Mitverantwortlichkeit der NO-Synthase für die Superoxidproduktion gedeutet.

Auch die vergleichende Anfärbung von Gefäßquerschnitten mit DHE zeigte einen starken Anstieg der Superoxidproduktion hypertensiver Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren.

Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass es unter ATII-Infusion zu einer Expressionssteigerung der NO-Synthase kommt, statt einem zu erwartenden Anstieg von  $\cdot\text{NO}$  wird allerdings eine Abnahme der  $\cdot\text{NO}$ -Bioverfügbarkeit beobachtet.

Die Erklärung hierfür wird u.a. in einer Funktionsstörung der NO-Synthase vermutet.

Dieses Phänomen wird als NOS-Entkopplung bezeichnet und hat zur Folge, dass die NOS dann vermehrt Superoxid und gleichzeitig weniger  $\cdot\text{NO}$  produziert.

Die einzelnen Mechanismen, die diese Entkopplung bewirken, sind noch nicht ganz geklärt, es gibt jedoch verschiedene Theorien, die vermuten lassen, dass sowohl das Superoxidradikal  $\cdot\text{O}_2^-$  als auch das bei der Reaktion von  $\cdot\text{NO}$  und Superoxid entstehende Peroxynitrit für eine Oxidation und damit Inaktivierung der Kofaktoren der NO-Synthase verantwortlich sind (Cai et Harrison 2000).

Folglich kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die NO-Synthase einen entscheidenden Einfluß auf die vaskuläre Superoxid-Produktion nimmt.

Dies verdeutlicht, dass das Endothel also unter hypertensiven Bedingungen eine wichtige  $\cdot\text{O}_2^-$ -Quelle darstellt. Ergänzend kann gesagt werden, dass auch Veränderungen im NO-Signalweg gefunden werden können, in unseren Untersuchungen fanden sich Hinweise, dass

die Signalkaskade über cGMP deutlich abgeschwächt ist (Mollnau et al. 2002; Münzel et al. 2005).

## **6. Anhang**

### **6.1 Geräte**

#### **osmotische Minipumpen :**

Modell Alzet 2002, Alza Corp., Palo Alto, California

#### **Szintillationscounter:**

Beckman LS 1801 (LS 5800 Series) + Constant Temperature Accessory (Stufe 1)

Beckman LS 3801 (LS 5800 Series)

Beckman Instruments, Scientific Instr. Division, Irvine, California 92634, USA

#### **pH-Meter:**

Mikroprozessor pH-Meter CG 840

Schott Geräte GmbH, Hofheim am Ts.

#### **Rührmixer:**

IKA Combimag RCH Nr.42547

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

#### **Präzisionswaage:**

Mettler H51

#### **Laborwaage:**

Kern 510

Gottlieb Kern u. Sohn GmbH, Albstadt

#### **Blutdruckmessgerät :**

TSE Blood Pressure Monitor 209002series

TSE Systems GmbH

Siemensstr. 21

61352 Bad Homburg

**Heizvorrichtung für das Wasserbad:**

Haake C1 (Fisons), HS 89100

Fa. Haake, Karlsruhe

**Vortexer:**

Eppendorf-Vortexer

Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

**DNA/RNA-Geldokumentation:**

Biometra BioDoc II™

**Elektrophoresekammern:**

DNA/RNA: Pharmacia Biotech GNA 200

Protein: BioRad Mini-Protean II

**Entwickler:**

AGFA, Curix 60

**Photometer:**

DNA/RNA: Pharmacia Biotech GeneQuant

Protein: Pharmacia Biotech Ultrospec 3000

**Proteintransferkammer:**

BioRad Mini-Trans-Blot Transfer Cell

**6.2 Pharmaka und Chemikalien**

Sigma Chemical Co, St.Louis, MO 63178 USA:

- Acetylcholin
- Indomethacin
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- Lucigenin
- NADH, reduzierte Form
- NADPH, reduzierte Form
- Na-Hepes
- Nitroprussid-Natrium
- Serotonin
- Xanthin (X)
- Xanthinoxidase (XO)
- Phenylephrin
- Angiotensin II
- Cytochrome C (type III, from horse heart)
- Superoxiddismutase (SOD)

Bio-Rad:

- Dye Reagent Concentrate (Farbstoff-Konzentrat, Cat. 500-0006)
- Prot Assay Standard I (Lyophilized Bovine Plasma (Gamma-Globuline)) Cat. 500-0005
- PKC-ELISA-KIT (Cat. 539484)

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
- $\text{KCl}$  M=74,56 g/mol
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  M=246,48 g/mol
- $\text{NaCl}$  M=58,44g/mol
- $\text{NaHCO}_3$  M=84,01 g/mol
- $\text{NaOH}$  10M
- $\text{HCl}$  10M
- $\text{KCN}$

Bayer AG, Wuppertal:

- Bay 10-6734 mikronisiert, Ch.-B.:532506 D; Pr.-Sur.:231473-02

Millipore

- Millipore-filtriertes Wasser

Linde-Gase, Hannover:

- Carbogen

Chroma, Deutschland:

- Fettrot 7B, No, 1A727

### 6.3 Pufferlösungen

Konzentrationen in mmol:

- Krebs-Hepes-Puffer : NaCl 118,3; KCl 4,69; CaCl<sub>2</sub> 1,87; MgSO<sub>4</sub> 1,20; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,03; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; HEPES 20,0 und Glucose 11,1; pH 7,4
- P-Puffer : NaCl 118,3; KCl 4,69; CaCl<sub>2</sub> 1,87; MgSO<sub>4</sub> 1,20; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,03; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 und Glucose 11,1; pH 7,4.
- VASP-Hg-Puffer : Tris-HCl 20; Sucrose 250; EGTA 3; EDTA 20; pH 7,5
- VASP-Hg-Lösung: 100 µl Aprotinin (1 mg/ml); 10 µl Leupeptin (5 mg/ml); 10 µl
- Pepstatin (2 mg/ml); 50 µl PMSF (0,1 M); 10 µl Cantharidin (1 mM); 1 %(v/v) Triton X-100 ad 10 ml VASP-Hg-Puffer (3.3.33)
- TENN-Puffer: 50 mM Tris-HCl; EDTA 5; NaCl 150; 0,5 %(v/v) NP-40; pH 7,4
- TENN-Hg-Lösung: 100 µl Aprotinin (1 mg/ml); 10 µl Leupeptin (5 mg/ml); 10µl Pepstatin (2 mg/ml); 50 µl PMSF (0,1 M) ad 10 ml TENN-Puffer

- 3 x Lämmli-Probenpuffer: Tris-HCl 125 (pH 6,8); 10 %(w/v) Natriumdodecylsulfat; 5 %(v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 17 %(v/v) Glycerin (86 %iges); 0,01 % Bromphenolblau

#### **6.4 Computer und Zubehör**

Apple Macintosh Power PC

benutzte Programme:

- MS Excel 5.0
- MS Word
- NIH Image
- Cricket Graph
- MacLab
- MS Chart
- ScanPack 3.0 (Biometra).
- Densitometrie: Scanner: Epson GT-9600 mit Durchlichtaufsatz Model EU-35

#### **6.5 Sonstige Materialien**

- Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml, Combitips
- Schott Erlenmeyerkolben 100-5000ml ,Glaszylinder500-2000ml,
- Sarstedt Pipettenspitzen 10-200 $\mu$ l, 200-1000 $\mu$ l, 1-10ml, Mikroküvetten
- Packard Econo Glass Vials
- Probengefäße 20ml mit Schraubverschluß
- Reagenzgläser 10ml
- Braun, Melsungen: Spritzen, Kanülen

#### **6.6 Antikörper**

Anti-VASP (polyclonal, IE273)

ImmunoGlobe

Anti-VASP-Ser239-Phospho (monoclonal, 16C2) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. U. Walter (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Abu-Soud HM, Wang J, Rousseau DL, Fukuto JM, Ignarro LJ, Stuehr DJ: Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. *J Biol Chem* 1995;270: 22997- 23006
2. Arnal JF, Michel JB, Harrison DG: Nitric oxide in the pathogenesis of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;4:182–188
3. Arnold WP, Mittal CK, Murad F : Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3:5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3203-3207
4. Axelsson KL, Wikberg JES, Andersson RGG : Relationship between nitroglycerine cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sci* 1979; 24: 1779-1786
5. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109(1): 33 -44.
6. Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A: Shear stress and the endothelium. *Kidney Int Suppl.* 1998; 67: S100-S108.
7. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. *Free Radic Biol Med* 1990; 9(3): 235-243.
8. Bech Laursen J, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman B, Harrison DG: Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997;95: 588–593.
9. Becker RH; Wiemer G; Linz W. Preservation of endothelial function by ramipril in rabbits on a long-term atherogenic diet. *J-Cardiovasc-Pharmacol.* 1991; 18 Suppl 2: S110-5
10. Böger RH; Bode-Böger SM; Thiele W; Junker W; Alexander K; Frölich JC: Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation.* 1997 Apr 15; 95(8): 2068-74
11. Böger R.H., Bode-Böger S.M., Szuba A., Tsao P.S., Chan J.R., Tanphao O., Blaschke T.F., Cooke J.P. Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterinemia. *Circulation* 1998; 98: 1842-1847
12. Bolton TB: Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol-Rev.* 1979; 59: 606-718
13. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 May 7; 72: 248-54

14. Brandes RPL: In-Vitro-Untersuchung in der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz; Dissertation Med.Hochschule Hannover, 1995
15. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87(10): 840-844.
16. Calver A, Collier J, Moncada S, Vallance P: Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginin in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears normal. *J Hypertension* 1992; 10:1025-1031
17. Chalmers J: WHO-ISH hypertension Guidelines Committee.1999 WorldHealth Organisation-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *Journal of Hypertension* 1999; 17,; 151-185.
18. Cooke JP, Dzau J, Creager A: Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is corrected by L-arginine. *Basic-Res-Cardiol.* 1991; 86 Suppl 2: 173-81
19. Cooke JP : Does ADMA Cause Endothelial Dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2032-2037.
20. Chen PY, Sanders P W : L-Arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J. Clin. Invest.* 1991; 88, 1559- 1567
21. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PBMWM: Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165: 196-203
22. Chung SJ, Fung HL: A common enzyme may be responsible for the conversion of organic nitrates to nitric oxide in vascular microsomes. *Biochem-Biophys-Res-Commun.* 1992; 185: 932-937
23. Chung SJ, Fung HL: Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. *J-Pharmacol-Exp-Ther.* 1990; 253:614-619
24. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, and Harrison DG: Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 79: 984-991, 1996
25. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM: Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ-Res.* 1991 Feb; 68(2): 450-6
26. de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Harding JW, Inagami T and Timmermans PB: Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* 1995; 25: 924-927.

27. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW and Unger T: International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 415-472.
28. Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ: Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation*. 1996; 94: 2756-2767
29. Dinerman JL, Lawson DL, Mehta JL: Interactions between nitroglycerin and endothelium in vascular smooth muscle relaxation. *Am-J-Physiol*. 1991; 260: H698-H701
30. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG : Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res*. 2000;86: 347-354
31. Feelisch M, Noack E: Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur-J-Pharmacol*. 1987, 139: 19-30
32. Finkel T: Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10(2):248-253.
33. Finkel T: Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol* 1999; 65(3): 337-340.
34. Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase, characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991; 42(10):1849-1857.
35. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q 4th, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK.: p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*. 1997;80:45–51.
36. Fung LF, Chung SJ, Bauer JA, Chong S, Kowaluk EA: Biochemical Mechanism of Organic Nitrate Action. *Am-J-Cardiol*. 1992 Sep; 70: 4B-10B
37. Furchgott RF: Role of Endothelium in Response of Vascular Smooth Muscle. *Circ-Res*. 1983; 53(5); 557-73.
38. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27; 288(5789): 373-6.
39. Furchgott RF, Vanhoutte PM :Endothelium derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3: 2007-2018 1988.

40. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ-Res.* 1988 Apr; 62(4): 749-56.
41. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured smooth muscle cells. *Circ Res*, 1994 ; 74: 1141-1148.
42. Griendling KK, Ushio-Fukai M.: NADH/NADPH oxidase and vascular function. *Trends Cardiovasc Med.* 1997;7:301–307.
43. Gyllenhammar H: Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J-Immunol-Methods.* 1987 Mar 12; 97(2): 209-13.
44. Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S: Nitric oxide and apoptosis. *Vitam. Horm.* 1999 57, 49- 77
45. Härtel U: Geschlechtsspezifische Inanspruchnahme medizinischer Hilfe. Ergebnisse der Münchner Blutdruckstudie. *Soz Präventivmedizin* 1988; 33: 148-155.
46. Halliwell B, Aruoma OI: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991; 281(1-2): 9-19.
47. Harrison DG: Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic Research in Cardiology*, 1994; 89: 87-102
48. Harrison DG: Endogenous and therapeutic nitrates in healthy and arteriosclerotic blood vessels *Schweiz-Rundsch-Med-Prax.* 1993 Oct 19; 82(42): 1172-6.
49. Harrison DG; Armstrong-ML; Freiman-PC; Heistad-DD: Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis. *J-Clin-Invest.* 1987 Dec; 80(6): 1808-11.
50. Harrison DG, Bates JN: The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation.* 1993 May; 87(5): 1461-7.
51. Harrison DG, Freiman PC, Armstrong ML, Marcus ML, Heistad DD: Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis. *Circ-Res.* 1987 Nov; 61(5 Pt 2): II74-80.
52. Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. : Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2000;43:1435–1438.
53. Heitzer T, Just H, Munzel T: Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation.* 1996 Jul 1; 94 (1): 6-9.
54. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling KK, Harrison DG, Forstermann U,

- Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus , *Circ Res* 2001 ;88: e14—e22.
55. Hüttner, I., Gabbiani, G.: Vascular endothelium in hypertension In: Genest, J., Kuchel, O., Hamet, P., Cantin, M. Hypertension: physiopathology and treatment, 1983 2nd ed. New York: McGraw- Hill, 473- 488.
  56. Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG.: Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. *Circ Res*. 1996;79:32–37.
  57. Ito A, Egashira K, Narishige T, Muramatsu K, Takeshita A : Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. *Jpn Circ J*. 2001 Sep;65(9):775-8.
  58. Johns RA: Endothelium, anesthetics, and vascular control. *Anesthesiology* 1993;79:1381 – 1391.
  59. Kawazoe T, Kosaka H, Yoneyama H, Hata Y: Acute production of vascular superoxide by angiotensin II but not by catecholamines *J Hypertens* 2000 Feb;18(2):179-85.
  60. Kielstein J T, Boeger RH, Bode-Boeger S M, Froelich J C, Haller H, Ritz E, Fliser D: Marked Increase of Asymmetric Dimethylarginine in Patients with Incipient Primary Chronic Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 170–176, 2002.
  61. Kojda G, Noack E: Nitric oxide liberating, soluble guanylate cyclase stimulating and vasorelaxing properties of the new nitrate-compound SPM 3672. *J-Cardiovasc-Pharmacol*. 1993 Jul; 22(1): 103-11.
  62. Kojda G, Beck JK, Meyer W, Noack E: Nitrovasodilator-induced relaxation and tolerance development in porcine vena cordis magna: dependence on intact endothelium. *Br-J-Pharmacol*. 1994 Jun; 112(2): 533-40.
  63. Landmesser U, Dikalov S, Russ Price S, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG : Oxidation of Tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension *J. Clin. Invest.* 111:1201–1209 (2003).
  64. Laragh JH, Baer L, Brunner HR, Buhler FR, Sealey JE, Vaughan, ED jr: Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. *Am. J. Med.* 1972;52, 633- 652.

65. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG.: A role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. 1997;95:588 –593.
66. Li H, Oehrlein SA, Wallerath T, Ihrig-Biedert I, Wohlfart P, Ulshofer T, Jessen T, Herget T, Förstermann U, Kleinert H (1998) Activation of protein kinase C alpha and/or epsilon enhances transcription of the human endothelial nitric oxid synthase gene. *Mol Pharmacol* 53(4) :630-7
67. Limas, C., Westrum, B., Limas, C. J., Cohn, J. N. : Effect of salt on the vascular lesions of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1980;2, 477- 489.
68. Lockette W, Otsuka Y, Carretero O. :The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986; 8:Suppl II:61-66
69. Lohmann S.M., Vaandrager A.B., Smolenski A., Walter U., de Jonge H.R.: Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*. 1997 Aug; 22(8): 307-312.
70. Lüscher TF, Vanhoutte PM : *The Endothelium : Modulator of cardiovascular function*. CRC Press, Boca Raton, 1991 USA.
71. Lugnier, C., Komasa, N.: Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur. Heart J*. 1993;14, 141- 148.
72. Marshall A. Corson, Natalie L. James, Shawn E. Latta, Robert M. Nerem, Bradford C. Berk, David G. Harrison : Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Fluid Shear Stress. *Circulation Research*. 1996;79:984-991.
73. Masutani H: Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. *Int J Hematol* 2000; 71(1): 25-32.
74. Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T: Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NAD(P)H Oxidase and Components of Nitric Oxide/cGMP Signaling. *Circ. Res*. 2002;90:e58-e65.
75. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine, a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(11): 1709-1715.
76. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA : Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.

77. Moncada S, Higgs A. :The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329(27): 2002-2012.
78. Mügge A, Elwell JH, Peterson TE, Harrison DG: Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial super-oxide dismutase activity. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1991;260: C219–C225.
79. Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A : Vascular Consequences of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling for the Activity and Expression of the Soluble Guanyl Cyclase and the cGMP-Dependent Protein Kinase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:1551-1557;
80. Münzel T, Kurz S, Rajagopalan S, Bennington W, Thompson A, Freeman B, Harrison DG: Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase: A new action for an old drug. *J Clin Invest* 1996;98:1465–1470.
81. Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, Oelze M, Skatchkov M, Warnholtz A, Duncker L, Meinertz T, Forstermann U.: Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res.* 2000;86:e7– e12.
82. Mulsch A, Oelze M, Kloss S, Mollnau H, Topfer A, Smolenski A, Walter U, Stasch JP, Warnholtz A, Hink U, Meinertz T, Munzel T.: Effects of in vivo nitroglycerin treatment on activity and expression of the guanylylcyclase and cGMP-dependent protein kinase and their downstream target vasodilator-stimulated phosphoprotein in aorta. *Circulation.* 2001;103: 2188–2194.
83. Mulvany MJ: Possible role of vascular oscillatory activity in the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J-Cardiovasc-Pharmacol.* 1985; 12 (Suppl. 6): S16-2.
84. Murad F, Waldman S, Molina C, Bennett B, Leitman D: Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res.* 1987; 249: 65-76.
85. Nathan C, Xie Q : Nitric oxide synthases: roles, tolls, controls. *Cell* 1994; 78: 915 – 918.
86. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide production. *J Clin Invest*91(6).2546-51

87. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.
88. Palmer RJM; Ashton D; Moncada S: Vascular endothelium cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333: 664-666.
89. Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988b; 153(3):1251-1256.
90. Panza JA, Casino PR, Badar DM, Quyyumi AA: Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. *Circulation* 1993;87:1475-81.
91. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE.: Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323:22-27.
92. Petersson J; Ryman T; Hoegstaett ED: Enhancement of depolarization-induced contractions after endothelium denudation is not related to an impaired production of nitric oxide or prostacyclin in the rabbit basilar artery. *Acta-Physiol-Scand*. 1993; 149: 467-74.
93. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang G X, Korth M, Aszodi A, Andersson K E, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, Hofmann F : Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J*. 1998 17, 3045- 3051.
94. Pueyo ME; Arnal JF; Rami J; Michel JB : Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol* 1998 Jan;274(1 Pt 1):C214-20.
95. Radl R, Beckman JW, Bush KM, Freeman BA.: Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991; 481-487.
96. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.: Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br-J-Pharmacol*. 1987; 92(1): 181-7.
97. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide

- production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *Journal of Clinical Investigation*, 1996; 97: 1916-1923.
98. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S.: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3375-3378.
  99. Rothermund L, Paul M: Hyper-tension and the renin-angiotensin system – evidence from genetic and trans-genic studies. *Basic Res Cardiol* 1998; 93Suppl 2:1–6.
  100. Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HHHW: Downregulation of soluble guanylylcyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1999;85: 534-541.
  101. Schroeder H: Cytochrome P-450 mediates bioactivation of organic nitrates. *J-Pharmacol-Exp-Ther.* 1992; 262: 298-302.
  102. Schroeder H; Noack-E: Thiol-dependent activation of guanylate cyclase by organic nitrates. *Z-Kardiol.* 1986; 75 Suppl 3: 20-4.
  103. Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mulsch A, Harrison DG, Sindermann I, Meinertz T, Munzel 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 –324.
  104. Smolenski A, Bachmann C, Reinhard K, Honig-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 Aug 7; 273(32): 20029-20035.
  105. Snyder SH: Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters?, *Science.*1992 257: 494 – 496.
  106. Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Luscher T, Rabelink T: Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1997;99:41– 46.
  107. Tohru Fukai, Martin R. Siegfried, Masuko Ushio-Fukai, Kathy K. Griendling, David G. Harrison: Modulation of Extracellular Superoxide Dismutase Expression by Angiotensin II and Hypertension. *Circ Res.* 1999;85:23-28.
  108. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J-Biol-Chem.* 1996 Sep 20; 271(38): 23317-21.

109. Vasquez Vivar J, Hogg N, Martasek P, Karoui H, Pritchard KA Jr, Kalyanaraman B : Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1999 Sep 17;274(38):26736-42.
110. Van de Voorde, J, Vanheel B, Leusen I: Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. *Circulation Research* 70 (1992), 1-8.
111. Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Brasen J-H, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch J-P, Griendling K, Harrison D-G, Bohm M, Meinertz T, Munzel T: Increased NADH-Oxidase-Mediated Superoxide Production in the Early Stages of Atherosclerosis Evidence for Involvement of the Renin-Angiotensin System. *Circulation.* 1999;99:2027-2033.
112. Wang Y, Marsden PA : Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;4: 12 – 22.
113. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M : Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163: 284-291.
114. Zeiher AM; Drexler H; Saubier B; Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J-Clin-Invest.* 1993 Aug; 92(2): 652-62.
115. Zeiher AM; Drexler H; Wollschlager H; Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation.* 1991 Nov; 84(5): 1984-92

## **8. Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 1996 bis Dezember 2005 in der Abteilung für Kardiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Münzel, dem ich für die Überlassung des Themas, seinen zahlreichen Anregungen, und seiner engagierten Betreuung herzlich danke.

Herrn Dr. Hanke Mollnau danke ich ganz besonders für seine großzügige tatkräftige Unterstützung, die Durchsicht dieser Arbeit sowie seine unermessliche Geduld bei allen labortechnischen Fragestellungen.

Meinen Kollegen im Labor der Klinik III für Innere Medizin danke ich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

## 9. Erklärung

Ich versichere, daß ich die hier vorliegende Arbeit selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit die aus anderen Werken stammen in ausnahmslos als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Diese Dissertation hat noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen und ist noch nicht veröffentlicht worden. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

## 10. Lebenslauf

### **Martin Bodenschatz**

geboren am 11. März 1974 in Hamburg

**Staatsangehörigkeit :** deutsch

**Familienstand:** ledig

**Eltern:** Dr. med. Klaus Bodenschatz  
Facharzt für Chirurgie

Dr. med. Ingrid Bodenschatz  
Fachärztin für Anästhesie

**Geschwister:** Julia Bodenschatz

### **Schulische Ausbildung**

1980-1984 Helene-Lange-Schule in Pinneberg

1984-1993 Theodor-Heuss Gymnasium in Pinneberg

### **Berufliche Ausbildung**

1994-1996 Ausbildung zum Bankkaufmann bei der Dresdner Bank AG in Hamburg

### **Universitäre Ausbildung**

5/96 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg

3/98 Physikum

3/99	1. Staatsexamen
09/00-04/01	Studium der Humanmedizin an der Università degli Studi di Palermo / Sizilien
8/01	2. Staatsexamen
10/01-02/02	1. Tertial des PJ in der Herzchirurgie des Ospedale Civico / Palermo
02/02-06/02	2. Tertial des PJ in der Kardiologie/Onkologie des UKE Hamburg
06/02-09/02	3. Tertial des PJ in der Allgemeinchirurgie des Albertinen KH Hamburg
11/02	3. Staatsexamen
seit 01/03	tätig als Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Chirurgie

#### **Famulaturen**

01/09-30/09/98	Chirurgie im Albertinen KH
17/07-13/08/00	Notaufnahme im Albertinen KH Hamburg
15/08-14/09/00	Kardiologie des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf
27/02-20/03/01	Chirurgie in der Universitätsklinik von Palermo

#### **Sprachkenntnisse**

Englisch und Italienisch fließend in Wort und Schrift  
Grundkenntnisse Französisch