

Aus dem Herzzentrum,  
Klinik und Poliklinik für Kardiologie / Angiologie,  
Universitäts – Krankenhaus Eppendorf  
Stellvertretender Ärztlicher Leiter Prof. Dr. med. Thomas Meinertz  
Martinistraße 52  
20246 Hamburg

Vasoprotektive Effekte des nicht – selektiven Endothelin–1 –  
Rezeptorantagonisten Bosentan auf die Gefäßreagibilität und endotheliale  
Superoxidanionenbildung nitrattoleranter Ratten

## Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Alina Maria Gerbes (geb. Czaja)

Aus Borntuchen

Hamburg, 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 26. 2. 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Meinertz

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. T. Minnel

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. S. Debus

# Inhaltsverzeichnis

1	ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG .....	1
2	EINLEITUNG .....	2
3	MATERIAL UND METHODEN .....	11
3.1	Auswahl und Behandlung der Tiergruppen.....	11
3.2	Entnahme und Präparation der Gefäße.....	11
3.3	Messungen der vaskulären Reaktivität im Organbad .....	12
3.4	Messungen der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz.....	15
4	AUSWERTUNG .....	18
4.1	Datenerfassung und Datenverarbeitung .....	18
4.2	Datenanalyse und statistische Methoden.....	18
5	ERGEBNISSE.....	20
5.1	Ergebnisse der Messungen im Organbad .....	20
5.1.1	Vasodilatation von Nitroglycerin und Acetylcholin .....	21
5.1.2	Sensivität gegenüber Vasokonstriktoren .....	23
5.2	ERGEBNISSE DER CHEMILUMINESCENZ – MESSUNGEN.....	26
6	DISKUSSION .....	29
6.1	Einleitung.....	29
6.2	Mechanismen der Nitrattoleranz .....	29
6.3	Nitrattoleranz, Superoxidanionen – Produktion und endotheliale Dysfunktion.....	33
6.4	Rolle der Proteinkinase C und des Endothelin – 1 in der Nitrattoleranz.....	39
6.5	Rolle des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems in der Nitrattoleranz .....	43
7	ZUSAMMENFASSUNG UND KLINISCHE BEDEUTUNG .....	47
8	ANHANG.....	49
8.1	Geräte, Materialien.....	49
8.1.1	Geräte .....	49
8.1.2	Pharmaka und Chemikalien:.....	50
8.1.3	EDV (Hard – und Software).....	51
8.1.4	Sonstige Materialien:.....	52
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	53
10	ABBILDUNGS – UND TABELLENVERZEICHNIS.....	56
11	LITERATURVERZEICHNIS .....	58
12	LEBENS LAUF .....	72
13	DANKSAGUNG .....	73
14	ERKLÄRUNG .....	74

# 1 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Die Wirksamkeit von organischen Nitraten bei Langzeittherapie ist entscheidend eingeschränkt durch die schnelle Entwicklung einer Nitrattoleranz und dem damit einhergehenden Wirkungsverlust.

Die Ausbildung einer Nitrattoleranz steht nach neueren Erkenntnissen im Zusammenhang mit einer Aktivierung des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems (RAAS) sowie einer gesteigerten Sauerstoffradikalproduktion. Letztere erscheint verantwortlich für einen gesteigerten Abbau von Stickstoffmonoxid (NO), dem aus Nitraten freigesetzten endothelialen Relaxationsfaktor.

Die Aktivierung des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems moduliert darüber hinaus die Expression von Endothelin – 1, dem potentesten endogenen Vasokonstriktor (Yanagisawa et al. 1988). Tatsächlich ist die vaskuläre Expression von Endothelin – 1 in Gefäßen von nitrattoleranten Versuchstieren gesteigert (Münzel et al. 1995<sup>3</sup>).

In dieser Arbeit soll untersucht werden,

- ob durch die Behandlung nitrattoleranter Versuchstiere mit dem Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan die Toleranzentwicklung und die Superoxidanionen – Bildung beeinflusst werden können.

Hierzu sollte ein Ratten – Tiermodell der Nitrattoleranz etabliert werden. Somit besteht ein Teil der Arbeit darin zu untersuchen,

- ob die chronische Behandlung mit Nitroglyzerin auch in dem hier verwandten Rattenmodell, ähnlich wie im vorbeschriebenen Kaninchenmodell, zur Entwicklung einer Nitrattoleranz führt und
- ob diese mit einer gesteigerten Superoxidanionen – Bildung einhergeht.

## 2 EINLEITUNG

Nitrate besitzen auch heute noch einen hohen Stellenwert bei der Behandlung der akuten Myokardischämie, der instabilen Angina pectoris und der Herzinsuffizienz. Historisch gesehen sind Nitrate zusammen mit dem Vasodilatator Hydralazin wirksam bei der Behandlung der Herzinsuffizienz (V – HEFT II) (Münzel et al. 1996<sup>1</sup>). Der klinische Nutzen beim Einsatz organischer Nitrate wird jedoch durch das rasche Auftreten einer Toleranzentwicklung (Nitrattoleranz) erheblich eingeschränkt. Hierunter versteht man die Wirkungsabschwächung bzw. einen vollständigen Wirkungsverlust des Pharmakons bei wiederholter oder chronischer Verabreichung.

Bereits 1888, kurz nach Einführung der organischen Nitrate in die Behandlung der Angina pectoris, wurde beobachtet, dass trotz einer über 100 – fachen Dosierung nicht mehr der initiale blutdrucksenkende Effekt von Glyceroltrinitrat zu erzielen war (Stewart 1888; Stewart 1905). Die Nitrattoleranz tritt generell bei kontinuierlicher Verabreichung organischer Nitrate unabhängig von jedem Dosierungsschema (Blasini et al. 1980; Blasini et al. 1985; Elkayam et al. 1991) und der Applikationsform auf (Jordan et al. 1986; Parker JO et al. 1987; Reiniger et al. 1984).

Der eigentliche Wirkmechanismus der Nitrate beruht klassischerweise auf der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), einem Molekül, das eine zentrale physiologische Rolle bei der Gefäßtonusregulation spielt und initial als Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) beschrieben wurde.

Furchgott und Zawadzki zeigten schon 1980, dass die Acetylcholin – induzierte arterielle Relaxation streng endothelabhängig verläuft. Sie postulierten daraufhin die Existenz eines Endothelium Derived Relaxing Factor. Die Identifizierung von EDRF als Stickstoffmonoxid gelang jedoch erst im Jahr 1987 (Palmer et al. 1987; Ignarro et al. 1987).

Es stellte sich im weiteren heraus, dass NO im Gefäßendothel aus der Aminosäure L – Arginin und Sauerstoff in einer NADPH – abhängigen Reaktion unter

Anwesenheit der Cofaktoren Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin synthetisiert wird (Palmer et al. 1988; Pollock et al. 1991). Als Reaktionsprodukt entsteht neben NO auch L – Citrullin. Diese Reaktion wird durch NO – Synthasen katalysiert, von denen drei Isoformen beschrieben sind: In Nerven – (nNOS oder NOSII) und Endothelzellen (eNOS oder NOSIII) werden überwiegend Kalzium – und Calmodulin – abhängige Isoformen konstitutiv exprimiert, während in Makrophagen die Kalzium – und Calmodulin – unabhängige Form nur nach Induktion durch z.B. Lipopolysaccharid und  $\gamma$  – Interferon nachzuweisen ist (iNOS oder NOSI), (Förstermann et al. 1991). Allerdings ist eine Induktion auch in glatten Muskelzellen und Fibroblasten möglich (Bernhardt et al. 1991).

Das von der NO – Synthase gebildete NO erreicht durch Diffusion sein quantitativ bedeutsamstes Rezeptorenzym, die lösliche Guanylatcyclase (sGC) (Braugher, 1983). Dieses bildet einen wichtigen intrazellulären Botenstoff (*second messenger*) aus der Familie der zyklischen Nukleotide, das cGMP. Das zyklische GMP hemmt den Einstrom von Kalium in die Zelle. Dadurch sinkt das intrazelluläre Kalzium und es kommt zur Vasodilatation der Arterie (Murad et al. 1994).

Über die Wirkung als endothelialer Vasodilatator hinaus besitzt NO in diversen Organsystemen unterschiedlichste Langzeitwirkungen: Hemmung der Thrombozytenaggregation und Granulozytenadhäsion (Alheid et al. 1989; Förstermann et al. 1989; Kubes et al. 1991), Hemmung von Kontraktion und Proliferation der glatten Muskelzelle (Garg und Hassid, 1989), Hemmung der Plättchenaggregation (D' Andrea et al. 1994) und des Fortschreitens der Artherosklerose (Cooke et al. 1992; Ohara et al. 1993), Regulation der Kontraktilität des Herzens (Schulz und Triggle, 1994) und Induktion einer Hypotonie beim septischen Schock (Wolfe und Dasta, 1995). Im Zentralnervensystem und im peripheren, nicht adrenergen, nicht cholinergen Neuron ist NO als Transmitter identifiziert worden (Paakkari und Lindsberg, 1995). Auch bei der unspezifischen Immunabwehr und an Autoimmunphänomenen ist NO beteiligt (Liew, 1995).

Sowohl für die normale Gewebepfusion als auch bei Ischämie (z.B. Myokardinfarkt) ist endotheliales NO zur Erhaltung einer Kollateralversorgung, Granulozyten – und Thrombozytenfunktionshemmung und Vasodilatation essentiell.

Man kann zwischen dem endogenen – d.h. vom Endothel durch physiologische Stimuli freigesetzten – und dem exogenen – z.B. durch von außen applizierte Nitrate freigesetzten – Stickstoffmonoxid unterscheiden.

Der wichtigste endogene Stimulus für die Freisetzung von endotheliale NO ist die sog. Schubspannung (shear stress) (Rubanyi et al. 1986): So wird z.B. die koronare Blutflusssteigerung bei zunehmender körperlicher Belastung durch NO moduliert (Bassenge et al. 1988).

Andere Reize für die NO – Freisetzung sind auf das Gefäß wirkende Hypoxie und verschiedene Substanzen wie beispielweise Acetylcholin oder Bradykinin (Rapport et al. 1983; Cohen et al. 1983). Außerdem stimuliert Thrombin, ein wichtiges Enzym der Gerinnungskaskade, die Bildung von NO aus dem Gefäßendothel (Lüscher et al. 1988). Unter physiologischen Bedingungen gewährleistet dieser Mechanismus, dass an Stellen, an denen es zu einer Aktivierung der Thrombozyten und der Gerinnungskaskade kommt, vom intakten Endothel sofort NO freigesetzt wird, das zu einer Vasodilatation und Hemmung der Thrombozytenaggregation führt. Somit wird der Thrombusbildung und einer Vasokonstriktion entgegengewirkt.

Organische Nitrate sind dagegen exogene NO – Donatoren und werden als Nitrovasodilatoren bezeichnet. Therapeutisch verfügbare NO – Donatoren sind organische Nitrate inkl. Pentaerythryltetranitrat (PETN) und Molsidomin.

Trotz der bereits mehr als 130 Jahre bestehenden Erfahrungen mit der klinischen Anwendung der Nitrate, war bis vor wenigen Jahren wenig über ihre tatsächliche Bioaktivierung bekannt.

Erst vor kurzem berichtete die Arbeitsgruppe um Stamler (Chen et al. 2002; Chen et al. 2005) von einer neuen Nitrat – Reduktase – Aktivität der mitochondrialen Aldehyddehydrogenase (ALDH – 2), die zumindest für die Biotransformierung der hochpotenten Nitrate Nitroglyzerin (NTG), Pentaerythryltetranitrat (PETN) und Pentaerythryltrinitrat (PETriN) in klinisch relevanten Dosen verantwortlich ist. Eine oxidative Hemmung der Aktivität und Expression der ALDH – 2 bei der

Dauerbehandlung mit Nitraten scheint eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Nitrattoleranz zu spielen (Sydow et al. 2004; Szocs et al. 2007).

Andererseits sind viele der beschriebenen Toleranz – Phänomene bei der Langzeitnitrattherapie in vivo bedingt durch eine neurohumorale Aktivierung (Parker JD et al. 1991; Packer et al. 1987) und einer damit in Zusammenhang stehenden Zunahme des Intravasalvolumens (Dupuis et al. 1990). Diese früh in der Behandlung auftretenden gegenregulatorische Mechanismen werden mit dem Begriff „Pseudotoleranz“ subsummiert.

Im Gegensatz zur Pseudotoleranz führt die chronische Behandlung mit Nitroglyzerin (NTG), dem bekanntesten Vertreter der organischen Nitrate, zum Verlust der Nitrovasodilator – Antwort, der sog. „vaskulären Toleranz“. Diese konnte sowohl nach kontinuierlicher intravenöser (Münzel et al. 1996<sup>2</sup>; Elkayam et al. 1987), oraler (Parker JO et al. 1987) als auch transdermaler Gabe (Roth et al. 1987) von Nitroglyzerin nachgewiesen werden. Dementsprechend führt die NTG – Dauertherapie zu einer erheblichen Toleranzentstehung im Sinne einer Abschwächung der Vorlast – Effekte, der koronardilatatorischen Wirkung sowie zu einer herabgesetzten Ischämieschwelle bei Patienten mit stabiler Angina pectoris oder Herzinfarkt.

Im Folgenden konnten neue Mechanismen definiert werden, die für die Nitrattoleranz und Kreuztoleranz gegenüber anderen endothelabhängigen und endothelunabhängigen Vasodilatoren verantwortlich sind (Boesgard et al. 1994).

Als entscheidend erwies sich der Zusammenhang zwischen der Nitrattoleranz und sowohl einer gesteigerten vaskulären Superoxid – Produktion ( $O_2^-$ ) (Münzel et al. 1995<sup>2</sup>) als auch einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber Vasokonstriktoren (Zierhut et al. 1996; Münzel et al. 1995<sup>2</sup>), die Folge einer tonischen Aktivierung der Proteinkinase C ist.

Diskutierte Quellen der Superoxidproduktion sind der mitochondriale Komplex I der Atmungskette (Esplugues et al. 2006), die NADPH Oxidasen sowie eine dysfunktionelle („entkoppelte“) endotheliale NO – Synthetase (Münzel et al. 2005).

Superoxid und NO reagieren miteinander direkt unter Bildung von Peroxynitrit, welches die Nitrattoleranz durch Förderung der NOS-Entkopplung (Laursen et al. 2001) und Inhibition der sGC und Prostacyclin – Synthetase weiter unterhält (Hink et al. 2003). Dieses sog. „Oxidative Stress – Konzept“ der Nitrattoleranz macht verständlich, warum Radikalfänger bzw. Substanzen, die indirekt antioxidativ wirken, Toleranzphänomene positiv beeinflussen.

Interessanterweise fielen bei der Suche nach einer möglichen Quelle für die gesteigerte Superoxidanionen – Produktion Parallelen zwischen einer experimentellen Behandlung mit Nitroglyzerin und Angiotensin II (AT II) auf.

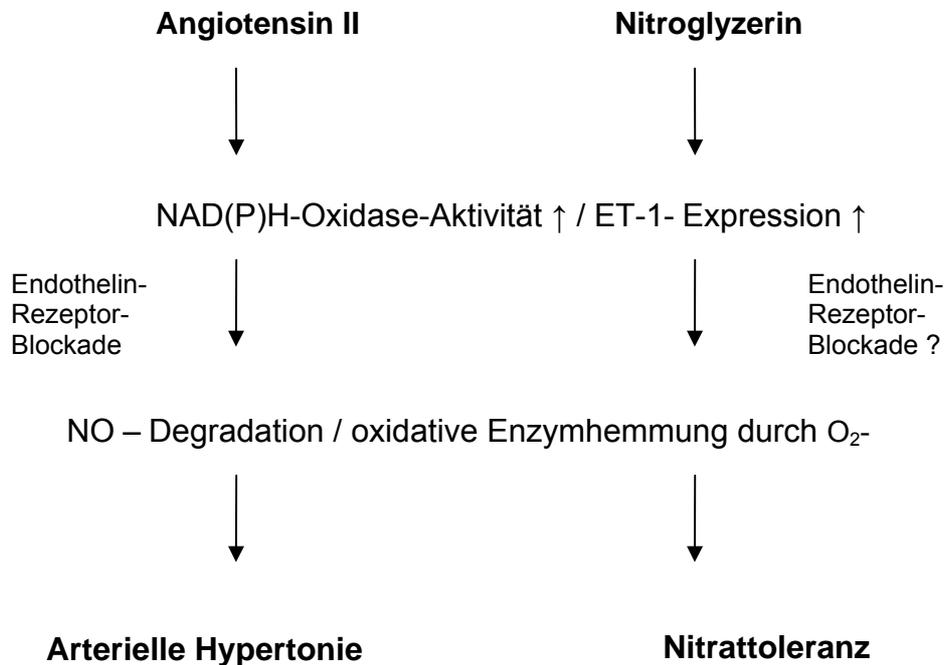
Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass sowohl die Infusion von Nitroglyzerin als auch von Angiotensin II in ähnlicher Weise, nämlich über die Aktivierung der NADPH – abhängigen Oxidase, zu einer Steigerung der vaskulären Superoxidanionen – Produktion führen kann, die maßgeblich für die Entstehung der Nitrattoleranz verantwortlich zu sein scheint (Rajagopalan et al. 1996; Münzel et al. 1995<sup>2</sup>).

Tatsächlich steigert die Nitratbehandlung ähnlich wie die Behandlung mit Angiotensin II die Empfindlichkeit gegenüber anderen Vasokonstriktoren (Zierhut et al. 1996; Münzel et al. 1995<sup>3</sup>; Heitzer et al. 1998), ein Effekt, der zumindest teilweise durch den potenten endogenen Vasokonstriktor Endothelin mediiert zu sein scheint (Münzel et al. 1995<sup>3</sup>).

In Übereinstimmung dazu konnte gezeigt werden, dass sowohl eine AT II – als auch eine NTG – Behandlung *in vivo* zu einer Steigerung der Endothelinexpression im glatten Gefäßmuskel führt (Rajagopalan et al. 1996). Ein Zusammenhang zwischen Nitrattoleranz und Renin – Angiotensin – System konnte auch durch die vasoprotektiven Effekte von ACE – Hemmern und AT1 – Rezeptorantagonisten bei der experimentellen Nitrattoleranz beschrieben werden (Kurz et al. 1999).

Ferner konnte gezeigt werden, dass die durch Angiotensin II vermittelte arterielle Hypertonie mit einer oxidativ bedingten NO – Degradation einhergeht, die nicht nur durch die Superoxiddismutase (SOD), sondern auch durch die Blockade des

Endothelin – ET<sub>A</sub> – Rezeptors inhibiert werden kann (Münzel T, Harrison DG, 1997).



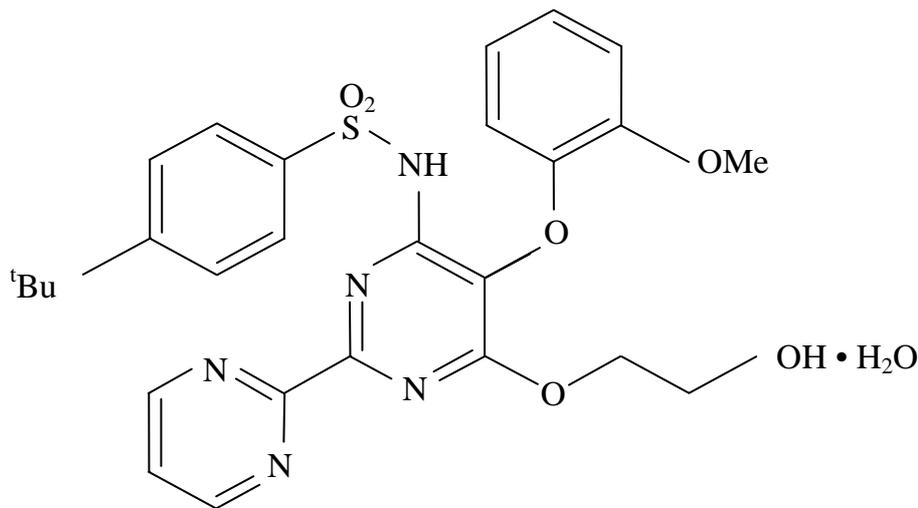
**Abbildung 1:** Schema einer Steigerung des oxidativen Stress bei arterieller Hypertonie und Nitrattoleranz. (O<sub>2</sub><sup>-</sup> = Superoxidanion, NO = Stickstoffmonoxid, NAD(P)H = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, ET – 1 = Endothelin)

Ob eine Endothelin – Rezeptor – Blockade das Auftreten der Nitrattoleranz verhindern kann, ist jedoch bisher unklar.

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung des Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan auf die Nitrattoleranz *in vivo* untersucht.

Bosentan wird eingesetzt als effektives Therapeutikum bei pulmonaler Hypertonie, wobei es die Belastungskapazität verbessert und die Krankheitsprogression verzögert (Giaid et al. 1993).

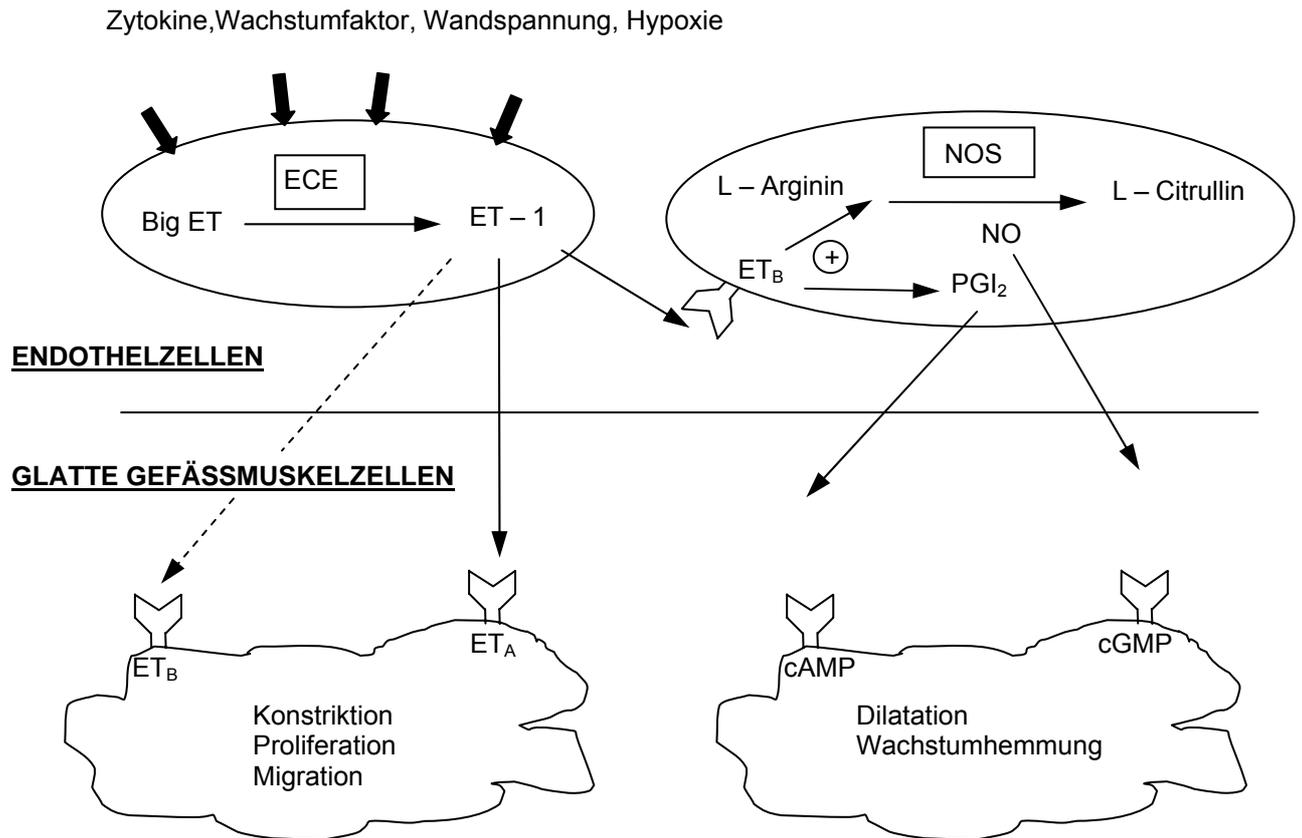
Bosentan (4-tert-Butyl-N-[6-(2-hydroxy-ethoxy)-5-(2-methoxy-phenoxy)-2,2'-bipyrimidin-4-yl]-benzenesulfonamidmonohydrat) ist ein kombiniertes geringgewichtiges Molekül (Molekulargewicht 569,64), das in der Lage ist beide bekannten humanen Endothelinrezeptoren A und B (ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub>) zu hemmen (Investigational Drug Brochure, 1997).



**Abbildung 2:** Die Strukturformel von Bosentan.

ET<sub>A</sub> ist in Zellen der glatten Muskulatur vorhanden und vermittelt dort eine Vasokonstriktion sowie eine Zellproliferation (Hosada et al. 1991). ET<sub>B</sub> ist in Endothelzellen und bestimmten Zellen der glatten Muskulatur und Makrophagen lokalisiert (Ogawa et al. 1991). Die Aktivierung von ET<sub>B</sub> stimuliert die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Prostazyklin und wirkt anti-apoptotisch (Niwa et al. 2000).

In der folgenden Abbildung wird die Reaktion zwischen ET-1 auf die Endothel- / Glattmuskelzellen und ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> Rezeptoren gezeigt (Rich et al. 2003).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Endothelin – 1 – Stoffwechsels. (ET – 1 = Endothelin – 1, ECE = ET – Converting – Enzym, NOS = NO – Synthase, PGI<sub>2</sub> = Prostazyklin, NO = Stickstoffmonoxid, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> = Endothelinrezeptoren A und B)

Initial wurde ET – 1 als potentester endogener Vasokonstriktor beschrieben (Yanagisawa et al. 1998). Physiologischerweise antworten die Endothelzellen auf Stimulation durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Wandspannung und Hypoxie mit einer erhöhten ET – 1 Produktion (Rich et al. 2003). Der Nettoeffekt einer Stimulation von ET<sub>A</sub> Rezeptoren resultiert in einer Vasokonstriktion, Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen und überwiegt der Vasodilatation durch ET<sub>B</sub> Rezeptoren der Endothelzellen und einer indirekten Wachstumshemmung durch Produktion von NO und Prostazyklin (Rich et al. 2003). Pathologische Prozesse können in einer Hochregulation von ET<sub>A</sub> Rezeptoren im glatten Muskel resultieren und damit in den genannten, überwiegenden Effekten von ET – 1 (Haynes et al. 1995).

Ein solcher pathologischer Prozess scheint auch dem oxidativen Stress – Konzept der Nitrattoleranz zugrunde zu liegen, das anfänglich in Kaninchen beschrieben wurde, die mit transdermalen Nitroglycerin – Pflastern behandelt wurden (Münzel et al. 1995<sup>3</sup>). Dieses „Patch“ – Modell stellte sich jedoch auf die Dauer als tierpflegerisch aufwändig dar. Als Alternative bot sich ein Rattenmodell an, in dem Nitroglycerin mittels subkutan implantierter, osmotischer Minipumpen infundiert wird, das zudem eine Vergleichbarkeit zum Rattenmodell der Angiotensin II induzierten arteriellen Hypertonie gewährleistete.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals mit dieser Methode bei Ratten eine Nitrattoleranz induziert, indem Minipumpen über 3 Tage Nitroglycerin in einer Konzentration von 15 µg/kg/min freisetzen. Zur Untersuchung eines evtl. protektiven Effekts einer ET – 1 – Blockade wurden einige Tiere gleichzeitig mit dem nicht-selektiven Endothelinrezeptorantagonist Bosentan p.o. behandelt (100 mg/kg/d).

In dieser Arbeit sollten die folgenden Hypothesen untersucht werden:

1. Lassen sich die *in vivo* Nitrattoleranzphänomene (gesteigerte Superoxidproduktion, gesteigerte Vasokonstriktorsensitivität) des Kaninchenmodells auch im Rattenmodell bestätigen ?
2. Können die Toleranzphänomene durch eine Begleittherapie mit einem Endothelin – 1 Rezeptorantagonisten positiv beeinflusst werden ?

Die Untersuchung der Vasoreaktivität auf tonusändernde Pharmaka erfolgte im Organbad, die Superoxidanionen – Produktion wurde mit Hilfe der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz untersucht.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Auswahl und Behandlung der Tiergruppen

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar – Ratten mit einem Gewicht von 250 – 300g gewählt, die nach dem Zufallsprinzip einer der Untersuchungsgruppe zugeteilt wurden:

- KTR – Kontrollgruppe, die Standardfutter erhielt
  
- NTG – Tiergruppe, die mit Nitroglyzerin (Konzentration 15  $\mu\text{g}$  /kg /min s.c. für 3 Tage) behandelt wurde
  
- NTG + BOS – Tiergruppe, die mit Nitroglyzerin (Konzentration 15  $\mu\text{g}$  /kg /min s.c. für 3 Tage) und dem Endothelin – Rezeptorantagonisten Bosentan (100 mg/kg/die p.o. für 3 Tage) behandelt wurde

Für die durchgeführten Tierexperimente wurde von der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales, Amt für Gesundheits – und Veterinärwesen Hamburg die Genehmigung (Geschäftszeichen G 8151/591-00.33) am 23.4.96 erteilt, es handelte sich hierbei um einen Erweiterungsvertrag, der Hauptantrag wurde am 1.11.95 (G 816; 25/95) genehmigt.

Die Substanz Bosentan wurde von der Firma Roche bezogen.

Allen Tieren stand Standardrattenfutter der Firma Altromin und Wasser in beliebiger Menge zur Verfügung.

#### 3.2 Entnahme und Präparation der Gefäße

Der Versuchsbeginn war grundsätzlich vormittags zwischen 8 und 10 Uhr.

Um die post mortem eintretende Blutkoagulation zu verhindern, wurden unmittelbar vor Herbeiführen des Todes 1000 i.E. Liquemin <sup>®</sup> (Heparin-Natrium) i.v. injiziert.

Das Einschläfern des Tieres wurde mittels einer Überdosis Eunarcon<sup>®</sup> (Pentobarbital) i. v. vorgenommen.

Unmittelbar post mortem wurde dann mit einer scharfen Schere das Fell im Brust – und Bauchbereich durchschnitten und Abdomen und Thorax eröffnet. Zur Öffnung des Thorax wurden Rippen und Sternum zeltförmig durchschnitten und entfernt.

Die Aorta thoracica wurde aufgesucht und in einem Stück vom Herzen bis zum Zwerchfell unter möglichst geringem Zug entnommen. Sie wurde sofort in ein längliches Probengefäß mit Krebs / HEPES – Puffer (KH – Puffer, Zusammensetzung: NaCl 99,01 mmol/l; KCl 4,69 mmol/l; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mmol/l; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mmol/l; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 mmol/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,03 mmol/l; Na-HEPES 20,0 mmol/l; D – Glucose 11,1 mmol/l; pH 7,4) gegeben und fortan auf Eis gehalten.

Die entnommenen Blutgefäße wurden im Anschluß in mit KH – Puffer gefüllte Petrischalen gegeben, die bis zum eigentlichen Versuchsbeginn auf Eis gelagert wurden.

Die thorakale Aorta wurde mit Hilfe einer sehr feinen chirurgischen Pinzette und Federschere unter Schonung des Endothels von noch anhaftendem Bindegewebe freipräpariert.

Mit einem Skalpell wurde die Aorta in ca. 5 mm große Gefäßringe quer zur Verlaufsrichtung geschnitten. Die potentiell traumatisierten Endstücke wurden verworfen. Einige der erhaltenen Gefäßringe wurden mechanisch deendothelialisiert, indem der jeweilige Gefäßring vorsichtig über beide Arme einer geschlossenen Pinzette geführt und 10mal in jede Richtung über diese gerollt wurde.

### **3.3 Messungen der vaskulären Reaktivität im Organbad**

Unter physiologischen Bedingungen wurden Kontraktionen sowie Relaxationen der Gefäßringe auf pharmakologische Stimuli untersucht.

Die Organbäder waren mit jeweils 25 ml Phosphat – Puffer folgender Zusammensetzung gefüllt: NaCl 118,3 mM; KCl 4,69 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,87 mM; Mg SO<sub>4</sub> 1,20 mM; K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 1,03 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 mM; Glukose 11,1 mM. Ein pH – Wert von 7,4 wurde durch vorsichtige Titration von HCl 10 M beziehungsweise NaOH 10 M eingestellt.

Um die Bildung von vasoaktiven Prostaglandinen zu unterdrücken, wurden die Experimente stets in Anwesenheit von Indomethacin (10 µM) durchgeführt.

Die Gefäßringe wurden mit zwei Haken aus rostfreiem Stahldraht an einer Seite fixiert und an der anderen Seite mit einem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden.

Sie wurden vollständig von der Pufferlösung und einem Carbogen – Gasgemisch (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) umspült, um möglich physiologische Bedingungen zu gewährleisten. Eine konstante Temperierung der Organbäder auf 37 ° C wurde durch einen Wasserkreislauf inkl. Heizdraht und Pumpe erzielt, der die doppelwandigen Organbad – Behälter kontinuierlich umspülte. Die registrierten Kraftänderungen wurden über einen Verstärker zum aufzeichnenden Computer (Apple Power PC 601) weitergeleitet und digitalisiert. Hier wurde mit dem Programm MS – Chart eine Kurve erstellt, somit konnten Kontraktion bzw. Relaxation des Gefäßes visualisiert werden.

Die optimale Vordehnung, bei der eine maximale Kontraktion auf Kaliumchlorid herbeigeführt werden konnte, wurde in Vorexperimenten bestimmt und lag bei 3 g. Entsprechend wurden die Gefäßringe passiv in 0,5 g – Schritten auf dieses Niveau innerhalb einer Stunde vorgedehnt.

Vor dem Erstellen einer Konzentrations – Wirkungs – Kurve mittels Zugabe der vasoaktiven Substanzen wurde ein Waschvorgang durchgeführt, bei dem ein 2 – 3 maliger Austausch der Pufferlösung sowie eine 30 min. Equilibrationsphase erfolgte.

Nach zumindest 2 – maliger Konstrinktion mit je 80 mM Kaliumchlorid (KCl) wurde eine KCl – Dosiswirkungskurve mit aufsteigenden Konzentrationen 5, 10, 20, 40,

80 mM erstellt. Die KCl – Dosiswirkungskurve erlaubt die Bestimmung der maximal möglichen Kontraktion des Gefäßes, die für den weiteren Versuchsablauf als 100 % – ige Kontraktion definiert wurde. Vor Gabe der nächst – höheren Konzentration wurde das Erreichen eines stabilen Niveaus abgewartet.

Vor Durchführung einer Dosiswirkungskurve auf die Vasodilatoren Acetylcholin (ACh) und Nitroglyzerin (NTG) wurden die Gefäßringe mit  $10^{-7}$  Phenylephrin vor-konstringiert. Diese Konzentration entsprach einer etwa halbmaximalen Konstriktion, d.h. 30 – 50 % der maximalen Konstriktion auf KCl.

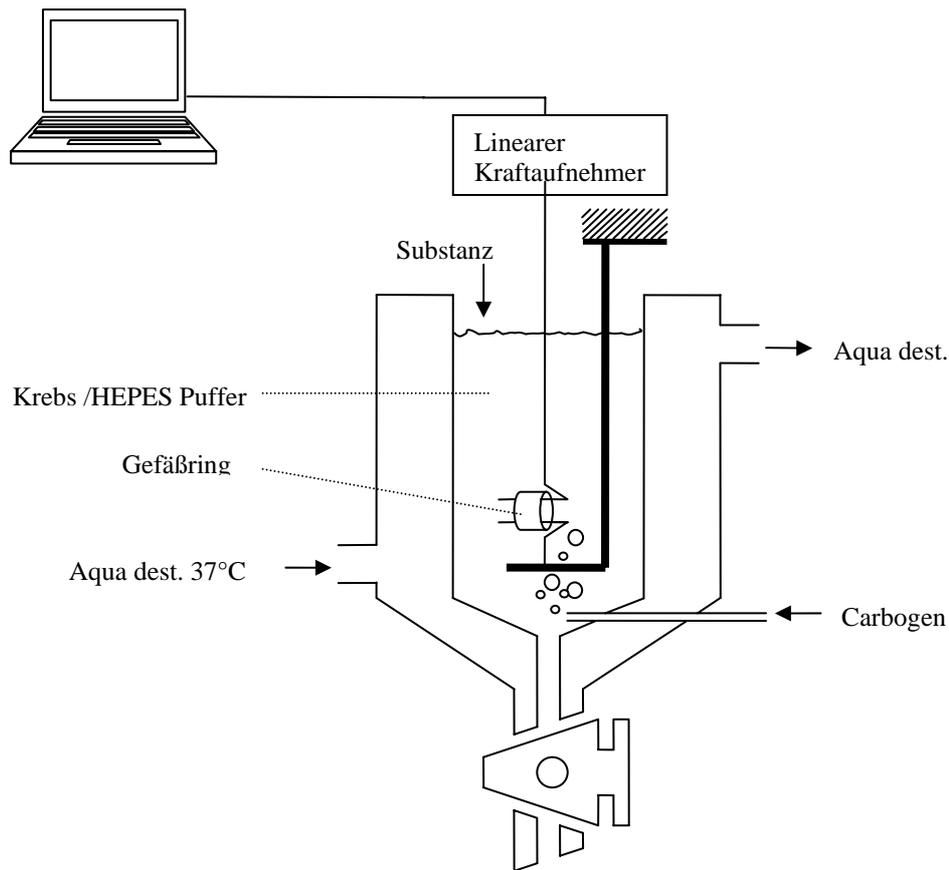
Durch kumulative Zugabe von Acetylcholin ( $10^{-9}$  bis  $10^{-5,5}$  M) und Nitroglyzerin ( $10^{-9}$  bis  $10^{-4,5}$  M) in halblogarithmischen Schritten konnte die endothelabhängige bzw. – unabhängige Vasodilatation gemessen werden.

Das Ausmaß des durch die Vasodilatoren schrittweise hervorgerufenen Tonusverlustes wurde als relative Relaxation gegenüber des Konstriktionsplateaus auf Phenylephrin ausgedrückt. Eine 100 % – ige Relaxation eines Gefäßrings entsprach somit dem Tonusniveau vor Konstriktion durch Phenylephrin. Es wurden dabei die  $ED_{50}$ , das heißt die effektive Dosis zum Erreichen einer halbmaximalen Relaxation, sowie die maximalen Vasorelaxationen in Prozentwerten bestimmt. Letztere entspricht der Effektivität, während die  $ED_{50}$  die Sensivität gegenüber der jeweiligen vasoaktiven Substanz definiert.

Bei deendothelisierten Ringen wurde lediglich die ACh – Höchstkonzentration eingesetzt. Die korrekte Endothelentfernung wurde bei den entsprechenden Ringen durch die fehlende Relaxation auf die Höchstkonzentration des endothelabhängigen Vasodilatator ACh überprüft.

Die Aufstellung einer Dosiswirkungskurve erfolgte ebenfalls mit additiv aufsteigenden Konzentrationen der Vasokonstriktoren (Phenylephrin  $3 \times 10^{-8}$  bis  $3 \times 10^{-5}$  M, Endothelin –  $1 \times 10^{-10}$  bis  $10^{-7}$  M).

Die Tonuserhöhung auf die Zugabe der Vasokonstriktoren wurde jeweils in Relation zur maximalen KCl – Antwort (100%) gesetzt.

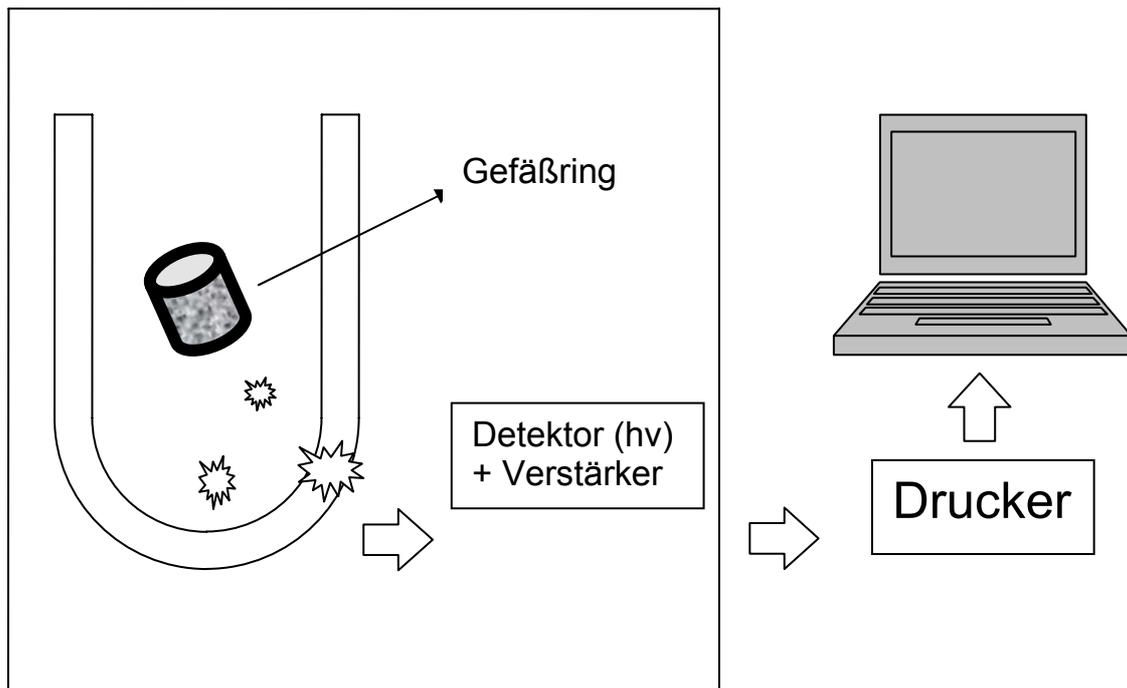


**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Der Aortenring ist durch feine Drähte mit dem Kraftumwandler verbunden. So kann jede Veränderung der Gefäßweite registriert werden und per EDV visualisiert und weiterverarbeitet werden.

### 3.4 Messungen der lucigeninverstärkten Chemilumineszenz

Die Superoxidanionen – Produktion in endothelintakten Aortenringen von Kontrolltieren und behandelten Tieren wurde durch die lucigeninverstärkte Chemilumineszenz (LDCL) bestimmt (Skatchkov et al. 1999 und Gyllenhammar, 1987).

Dabei reagieren die vaskulär generierten Superoxidanionen mit dem Lucigenin als Verstärkersubstanz unter Bildung von Lichtquanten ( $h\nu$ ) und werden vom Chemilumineszenz – Detektor als „ Impulse pro Minute ” (IPM) erfasst. Über einen angeschlossenen Drucker werden die IPM dann aufgezeichnet, Abbildung 5 zeigt schematisch das Messprinzip der Superoxiddetektion.



**Abbildung 5:** Vereinfachtes Messprinzip zur Superoxidationendetektion im Chemilumineszenzcounter. Der Aortenring schwimmt in dem mit der Verstärkersubstanz Lucigenin angereicherten Krebs – Hepes – Puffer. Die gebildeten Superoxidationen reagieren mit dem Lucigenin 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.

Vor Versuchsbeginn konnten die Aortenringe in den Reagenzienbehältern bei 37 Grad Celsius im Wasserbad (Fissons HS 89100) für 30 Minuten equilibrieren.

Ein Glasszintillationsgefäß enthielt 700 µl Krebs – HEPES – und Lucigenin (bis – N – methylacridium; Sigma) in einer Konzentration von 5 µmol. Der pH – Wert der KH – Lösung wurde mit HCl 10 M beziehungsweise mit NaOH 10 M auf 7,4 eingestellt. Um ein stabiles Chemilumineszenz – Hintergrundniveau sicherzustellen, wurde vor den eigentlichen Messungen eine sechsminütige Dunkeladaptation mit dem Glasszintillationsgefäß durchgeführt und die Signale im Chemilumineszenz – Zähler (Beckmann LS 1801), eingestellt auf den sogenannten „out – of – coincidence“ Modus, gemessen.

Nach der halbstündigen Equilibrationsphase wurden die Aortenringe in das Glasszintillationsgefäß überführt und die Szintillationsimpulse über 15 Minuten jede Minute gemessen. Anschließend wurden die Präparate für 24 Stunden in einem 90 Grad Celsius warmen Trockenschrank aufbewahrt. Um die Messdaten als Impulse pro Milligramm je Zeiteinheit (Impulse / mg / min) ausdrücken zu können, wurden die Gefäßringe nach der Trocknungszeit mit einer Präzisionswaage (Mettler H 51; Kleinstwert der Fehlergrenze 0,05 mg) gewogen.

## 4 AUSWERTUNG

### 4.1 Datenerfassung und Datenverarbeitung

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 (MS) Excel 5.0 erfasst und mittels Tabellenkalkulation weiterverarbeitet. Die Präsentation der Daten in Konzentrations – Wirkungs – Kurven (DWK) wurde mit den Programmen MS Excel und MS Power Point umgesetzt. Zur Textverarbeitung wurde das Programm MS Word verwendet. Für die benutzten Programme besitzt die kardiologische Arbeitsgruppe die notwendige Lizenz. Als Hardware wurden Power PC der Firma Apple benutzt.

Die Messdaten im Chemilumineszenz – Zähler wurden über einen Matrixdrucker ausgedruckt und anschließend mit dem Tabellenkalkulationsprogramm MS Excel 5.0 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 MS Excel und MS Power Point als Säulendiagramm.

### 4.2 Datenanalyse und statistische Methoden

Von allen Messwerten wurde die Standardabweichung sowie der Fehler des Mittelwerts (standard error of the mean = SEM) bestimmt. Dieser errechnet sich aus der Standardabweichung (StDev) / Wurzel der Stichprobengröße  $n$ . Alle Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Die  $ED_{50}$  – Werte der Organbaduntersuchungen wurden durch logarithmische Transformation berechnet. Für die Vergleiche innerhalb der Behandlungsgruppen ( $ED_{50}$  – Werte, maximale prozentuale Relaxation und Konstriktion sowie Superoxidanionen – Produktion) wurde der ungepaarte ONE WAY ANOVA – Test verwendet. Um die Signifikanz zu testen, wurde bei Stichproben mit unterschiedlicher Varianz der Student-

T – Test durchgeführt. Bei  $p < 0,05$  wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Ergebnisse der Messungen im Organbad

Der Ergebnisse der Vasoreaktivitätsuntersuchungen im Organbad sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

		KTR		NTG			NTG+Bos	
				Signifikanz			Signifikanz	
				vs. KTR	vs. NTG+Bos		vs. KTR	
<b>Potenz (ED<sub>50</sub> [-logM bzw. mM])</b>								
<b>NTG</b>	Mittelwert	-7,76	-6,68	<b>P &lt; 0.0001</b> *	<b>P &lt; 0.0001</b> #	-7,24	<b>P &lt; 0.0001</b> *	
	Std.Fehler	0,04	0,00					0,06
	Anzahl	80	25					44
<b>ACh</b>	Mittelwert	-7,31	-7,13	<b>P = 0.0435</b> *	P = 0.1577	-7,28	P = 0.7385	
	Std.Fehler	0,04	0,07					0,07
	Anzahl	93	31					42
<b>KCI</b>	Mittelwert	23,68	22,54	P = 0.4466	<b>P = 0.0003</b> #	28,39	<b>P = 0.0031</b> *	
	Std.Fehler	0,72	0,81					1,32
	Anzahl	76	49					20
<b>Phe</b>	Mittelwert	-7,06	-6,98	P = 0.5985	P = 0.8237	-6,94	P = 0.4754	
	Std.Fehler	0,10	0,10					0,15
	Anzahl	14	8					11
<b>ET1</b>	Mittelwert	-7,59	-7,99	P = 0.0538	P = 0.2209	-7,78	P = 0.1210	
	Std.Fehler	0,09	0,18					0,07
	Anzahl	10	8					14
<b>Effizienz (max. Relaxation [%])</b>								
<b>NTG</b>	Mittelwert	95,96	59,22	<b>P = 0.0036</b> *	P = 0.2638	82,06	<b>P &lt; 0.0001</b> *	
	Std.Fehler	0,63	5,10					1,26
	Anzahl	80	27					44
<b>ACh</b>	Mittelwert	85,73	75,94	<b>P &lt; 0.0001</b> *	<b>P &lt; 0.0001</b> #	84,28	P = 0.5717	
	Std.Fehler	1,40	2,28					3,00
	Anzahl	93	31					42
<b>KCI</b>	Mittelwert	2,61	2,90	<b>P = 0.0496</b> *	<b>P = 0.0480</b> #	2,58	P = 0.9461	
	Std.Fehler	0,10	0,11					0,11
	Anzahl	78	52					20
<b>Phe</b>	Mittelwert	92,31	116,48	P = 0.0590	P = 0.0506	92,84	P = 0.4869	
	Std.Fehler	7,95	8,12					7,54
	Anzahl	15	8					11
<b>ET1</b>	Mittelwert	124,96	118,81	P = 0.3450	P = 0.0704	110,85	<b>P = 0.0122</b> *	
	Std.Fehler	5,00	3,25					2,54
	Anzahl	10	8					14

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der isometrischen Reaktivitätsuntersuchungen an aortalen Segmenten in den 3 Behandlungsgruppen ausgedrückt als Potenz (halbmaximale Wirkdosis  $ED_{50}$ ) und Effizienz (maximale relative Relaxation) auf die verschiedenen Vasodilatoren (NTG – Nitroglycerin; Ach – Acetylcholin) und Vasokonstriktoren (KCl – Kaliumchlorid; Phe – Phenylephrin; ET1 – Endothelin – 1). \* indiziert Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe KTR; # indiziert Signifikanz gegenüber der Nitrat – und Bosentan – behandelten Gruppe NTG+Bos.

In der folgenden Abbildung ist die Wirkung einer dreitägigen Nitrattherapie auf das Relaxationsvermögen der isolierten Aortenringe dargestellt.

### 5.1.1 Vasodilatation von Nitroglycerin und Acetylcholin

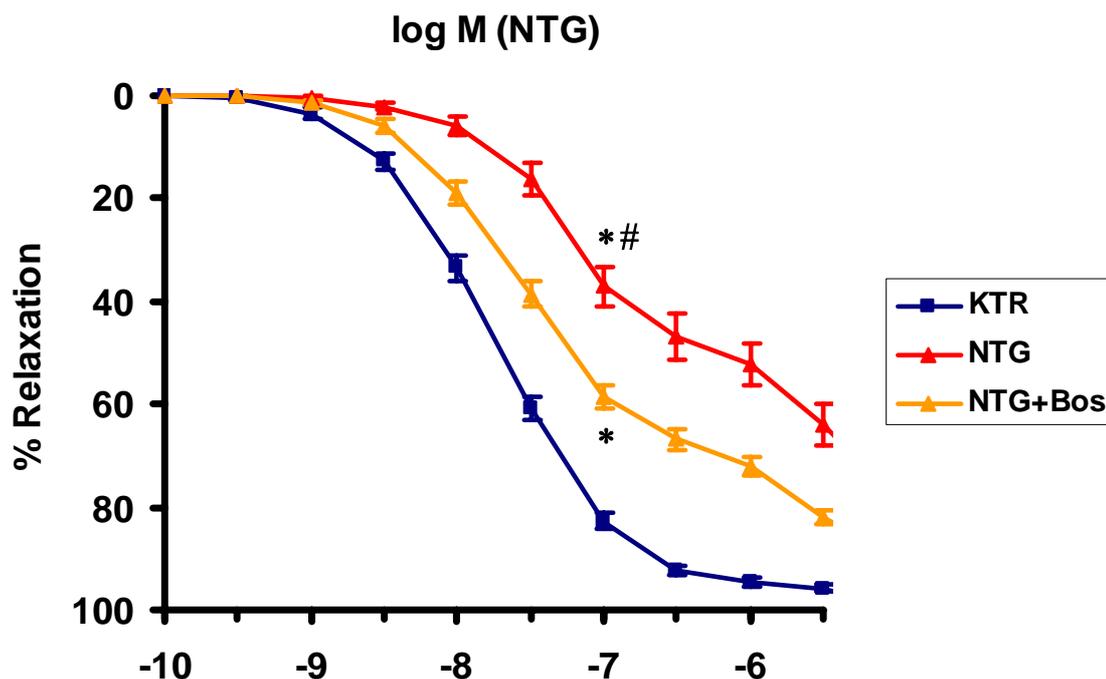
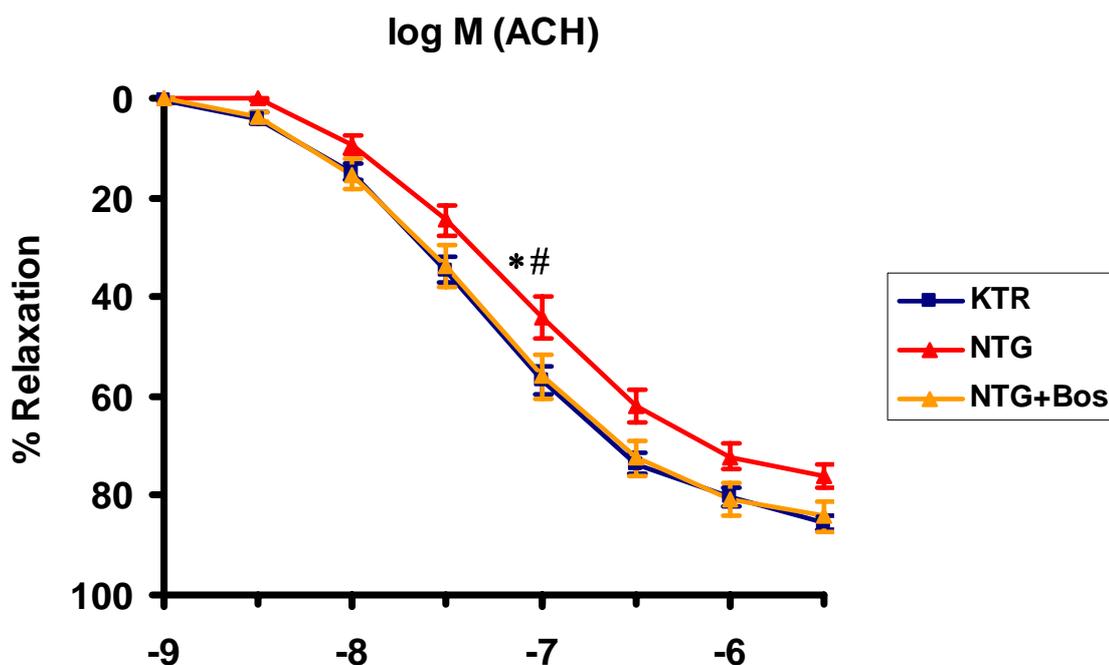


Abbildung 6: Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Nitroglycerin (NTG) induzierten endothelunabhängigen Vasodilatation in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach kontinuierlicher, dreitägiger NTG – (NTG) oder Nitroglycerin – und Bosentan – Gabe (NTG + BOS). Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler. \* indiziert Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe KTR; # indiziert Signifikanz gegenüber der Nitrat- und Bosentan-behandelten Gruppe NTG+Bos.

Die Abbildung 6 stellt die Konzentrations – Wirkungs – Kurve dar, auf der Ordinate der relative Tonusverlust in Prozent bezogen auf die maximale Vasokonstriktion mit Phenylephrin.

Die kontinuierliche, dreitägige Behandlung mit Nitroglyzerin führte zu einer Abschwächung dieses vasodilatatorischen NTG – Effektes im Sinne einer Toleranzentstehung. Die Toleranz drückt sich aus durch die signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations – Wirkungs – Kurve sowie eine signifikant verringerte maximale Relaxationsfähigkeit auf NTG gegenüber der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ).

Die gleichzeitige Behandlung mit Bosentan führte zu einer signifikanten Abschwächung der toleranzbedingten Rechtsverschiebung im Sinne einer teilweisen Aufhebung der Toleranzentwicklung. Eine vollständige Normalisierung der NTG bedingten Vasoreaktivität wurde durch die Behandlung mit Bosentan jedoch nicht erzielt, da sowohl die  $ED_{50}$  wie auch die maximale Relaxationsfähigkeit gegenüber der Kontrollgruppe weiterhin gestört war.



**Abbildung 7:** Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Acetylcholin (ACh) induzierten endothelabhängigen Vasodilatation in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach kontinuierlicher, dreitägiger NTG – (NTG) oder Nitroglyzerin – und Bosentan – Gabe (NTG + BOS). Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler. \* indiziert Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe KTR; # indiziert Signifikanz gegenüber der Nitrat – und Bosentan – behandelten Gruppe NTG+Bos.

Die Abbildung 7 stellt die Konzentrations – Wirkungs – Kurve auf den endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin dar.

Die kontinuierliche Nitratbehandlung führte, ähnlich wie bei den Relaxation auf NTG, auch bei den Versuchen mit ACh zu einem deutlich herabgesetzten Relaxationsvermögen im Sinne einer sog. "Kreuztoleranz", gleichzusetzen mit einer endothelialen Dysfunktion. Sowohl die Maximalrelaxation als auch die halbmaximale Wirkdosis  $ED_{50}$  waren dabei im Vergleich zu Kontrollgefäßen signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ).

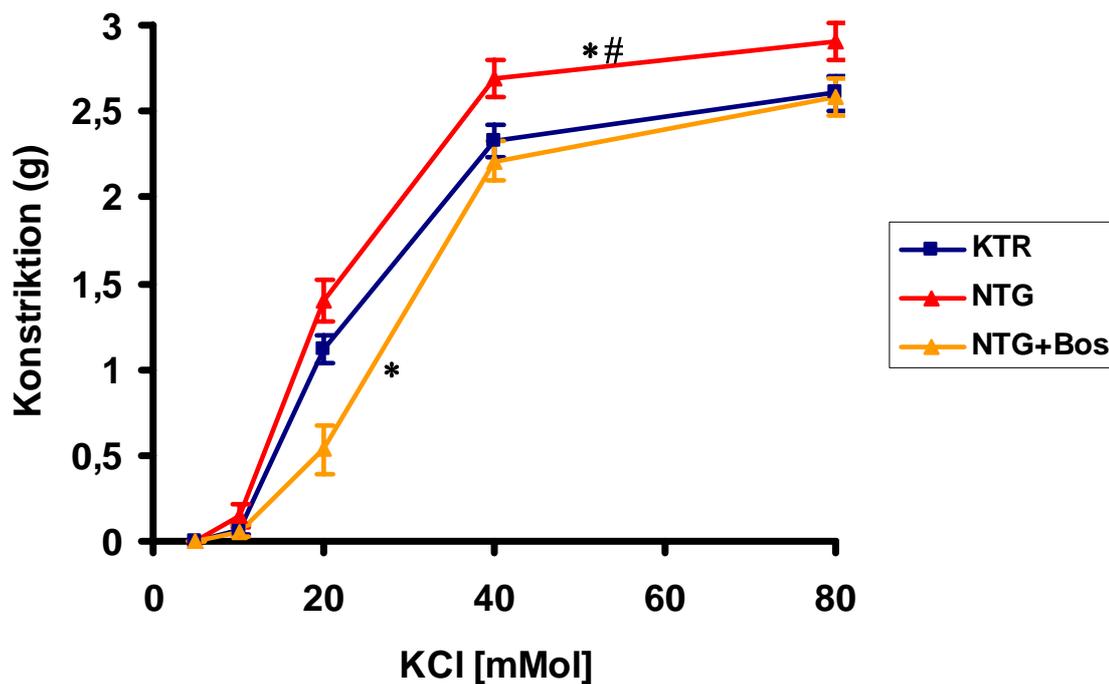
Durch die gleichzeitige Behandlung mit Bosentan zeigte sich eine vollständige Aufhebung der Kreuztoleranz mit einer  $ED_{50}$  und einer Maximalantwort, die sich nicht von der Kontrollgruppe, jedoch von der ausschließlich mit NTG behandelten Gruppe unterschied.

### 5.1.2 Sensivität gegenüber Vasokonstriktoren

Die dreitägige, kontinuierliche Behandlung von Wistar – Ratten mit Nitroglyzerin führte im Vergleich zu Kontrolltieren zu einer signifikanten Steigerung ( $p < 0,05$ ) der vaskulären Antwort auf die rezeptorunabhängige Konstriktion auf Kaliumchlorid (KCl). Hingegen war die Antwort auf die alpha – und Endothelin – Rezeptor – abhängigen Konstriktoren zwischen den Behandlungsgruppen weitgehend nicht unterschiedlich. Dies deutet auf eine im wesentlichen rezeptorunabhängige Steigerung der konstriktorischen Reaktivität bei nitratoleranten Gefäßen hin, die auch durch die Behandlung mit Bosentan nicht entscheidend beeinflusst wurde.

Die Wirkung der Nitrat – bzw. Bosentanbehandlung auf die Kontraktilität der Gefäßringe wurde ausgedrückt in Gramm für KCl bzw. in Relation zur maximalen KCl – Antwort im Falle von Phenylephrin und Endothelin – 1.

Die Reaktivität der Gefäßringe auf die verschiedenen Vasokonstriktoren ist in Abbildungen 8 bis 10 dargestellt.



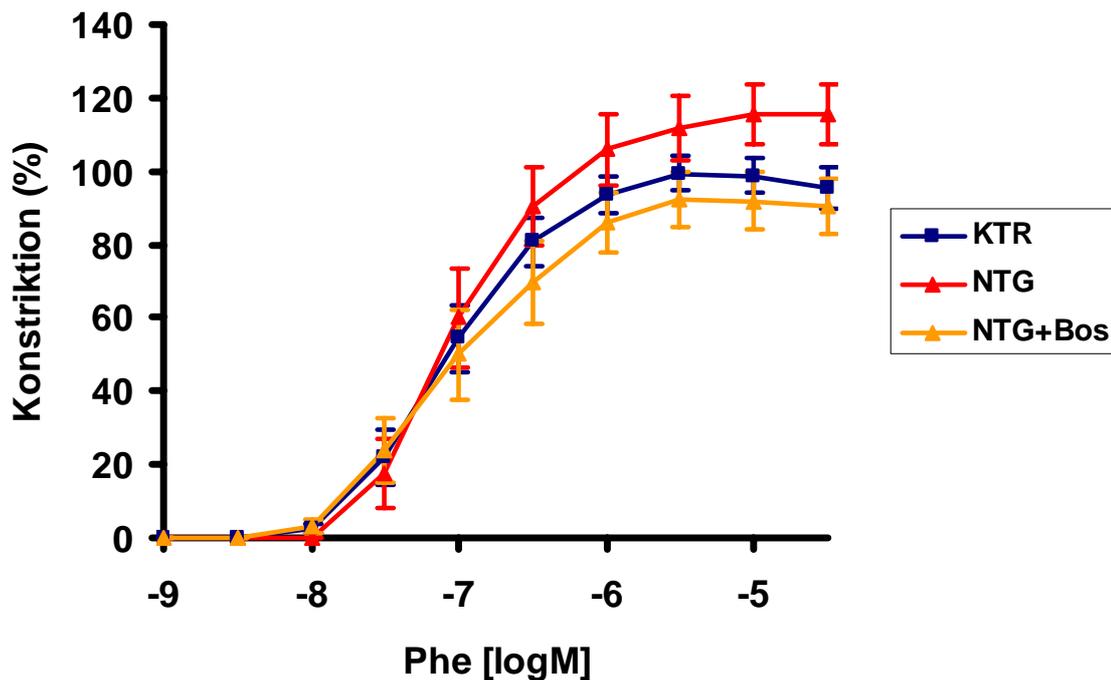
**Abbildung 8:** Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Kaliumchlorid (KCl) induzierten rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach kontinuierlicher, dreitägiger NTG – (NTG) oder Nitroglyzerin – und Bosentan – Gabe (NTG + BOS). Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler. \* indiziert Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe KTR; # indiziert Signifikanz gegenüber der Nitrat – und Bosentan – behandelten Gruppe NTG+Bos.

Die dreitägige Nitratbehandlung führte zu einer signifikanten Steigerung der maximalen konstriktorischen Antwort gegenüber der Kontrollgruppe.

Eine Begleittherapie mit Bosentan konnte sowohl die Maximalantwort wie auch die ED<sub>50</sub> signifikant gegenüber der alleinigen Behandlung mit NTG vermindern. Die

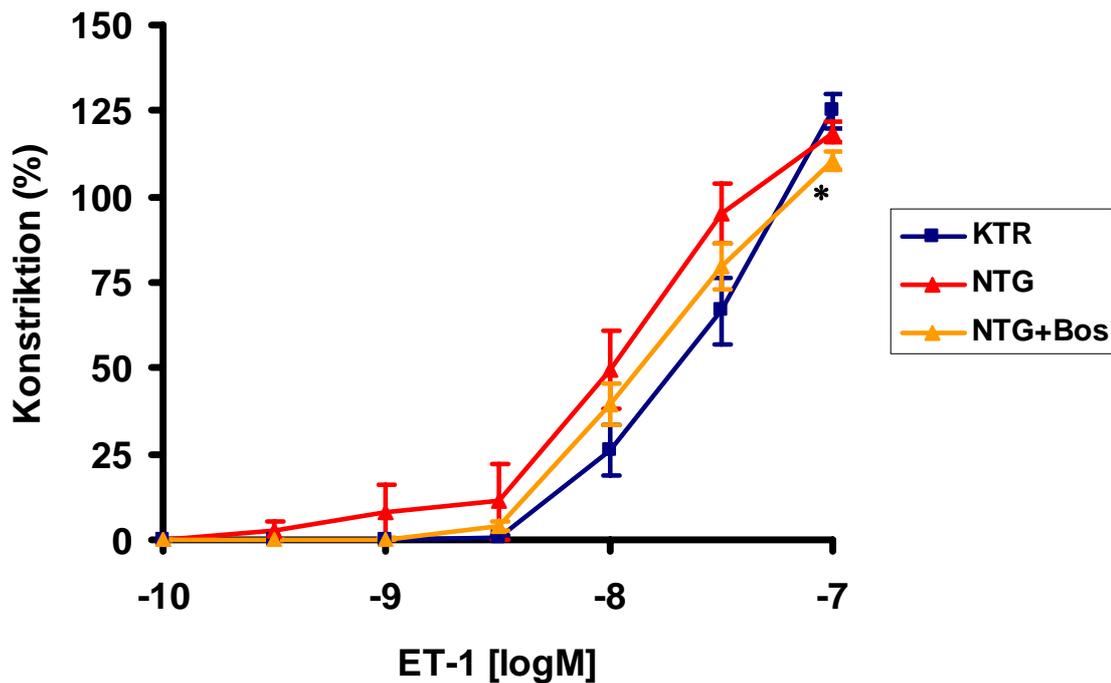
ED<sub>50</sub> der Gefäßsegmente der NTG+Bos Gruppe zeigten sich gegenüber der Kontrollgruppe nach rechts verschoben.

Die Ergebnisse weisen auf eine rezeptorunabhängige Steigerung der Konstriktionsfähigkeit in nitratintoleranten Gefäßen hin, die durch einen direkten Einfluss der Bosentan – Behandlung auf den kontraktilem Apparat des glatten Gefäßmuskels aufgehoben werden kann.



**Abbildung 9:** Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Phenylephrin (Phe) induzierten alpha-rezeptorabhängigen Vasokonstriktion in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach kontinuierlicher, dreitägiger NTG – (NTG) oder Nitroglyzerin – und Bosentan - Gabe (NTG + BOS). Mittelwerte ±Standardfehler

Das auf die maximale Kaliumchloridantwort normierte Konstriktionsvermögen auf den alpha – rezeptorabhängigen Vasokonstriktor Phenylephrin war zwischen keiner der Behandlungsgruppen signifikant unterschiedlich.



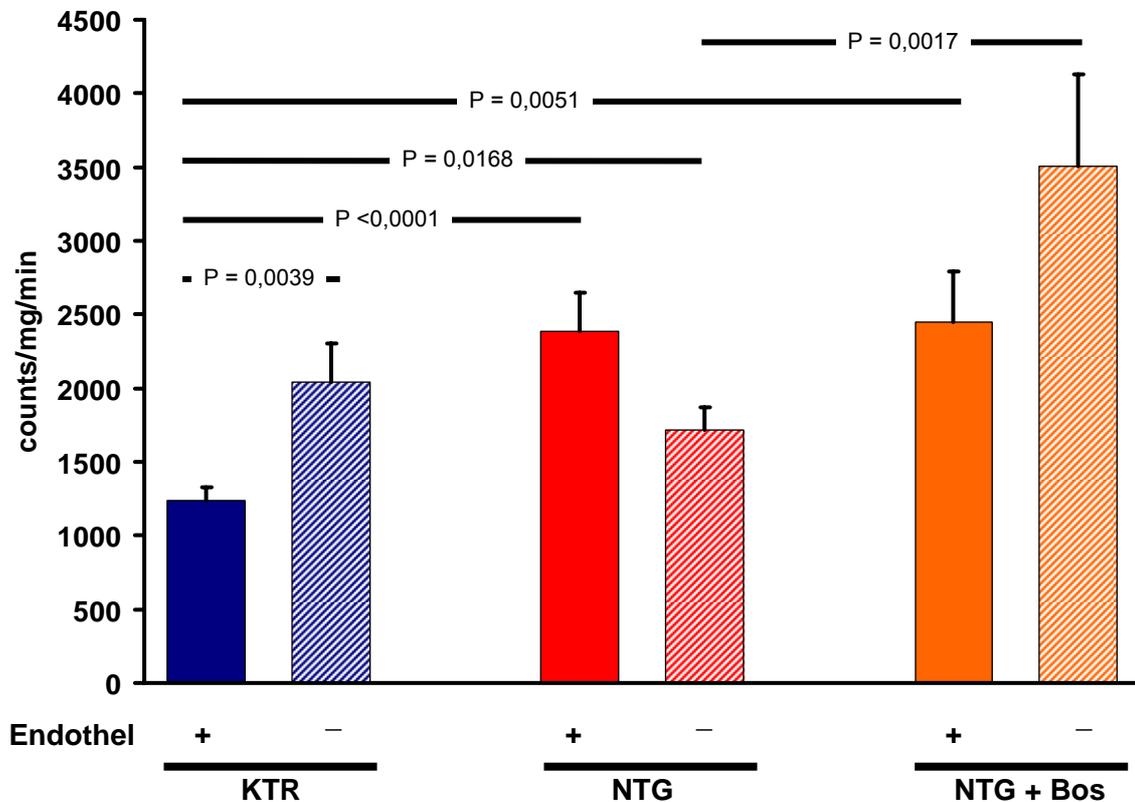
**Abbildung 10:** Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Endothelin – 1 (ET1) induzierten Endothelin – rezeptorabhängigen Vasokonstriktion in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach kontinuierlicher, dreitägiger NTG – (NTG) oder Nitroglycerin – und Bosentan – Gabe (NTG+BOS). Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \* indiziert Signifikanz gegenüber der zwischen NTG+Bos und der Kontrollgruppe KTR im Bezug auf die maximale Kontraktionsantwort.

Das auf die maximale Kaliumchloridantwort normierte maximale Konstriktionsvermögen auf den Endothelin – rezeptorabhängigen Vasokonstriktor Endothelin – 1 war in der NTG+Bos Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert. Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen.

## 5.2 ERGEBNISSE DER CHEMILUMINESCENZ – MESSUNGEN

Der Effekt der Nitrat – und Bosentan – Behandlung auf die Superoxidbildung, die mittels Lucigenin – verstärkter Chemilumineszenz (LDCL) in intakten Gefäßringen

gemessen wurde (ausgedrückt in Impulse / mg / min) wird in der Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** Superoxidanionen – Bildung von Gefäßringen mit oder ohne Endothel in den Kontrollgruppe (KTR) und den Behandlungsgruppen NTG (Nitroglyzerin für 3 Tage) oder NTG+Bos (Nitroglyzerin und Bosentan für 3 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler. Signifikante Unterschiede wie angezeigt ( $p < 0,05$ ).

Die Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) Produktion war in Gefäßen der NTG – Tiergruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf annähernd das Zweifache gesteigert ( $p < 0,05$ ).

Die Deendothelialisierung der Gefäßsegmente steigerte die Superoxidproduktion in Kontrollgefäßen signifikant. Dies ist Ausdruck dafür, dass unter Normalbedingungen die basale endotheliale NO – Bildung eine antioxidative Wirkung besitzt. Unter chronischer Nitratbehandlung gibt es Hinweise für eine Entkopplung der NO – Synthese, die zu einer Steigerung der Superoxidbildung auf Kosten der NO –

Produktion führt, was sich in einer tendenziellen Erniedrigung der reaktiven Sauerstoffradikale bei der Deendothelialisierung niederschlägt. Eine vollständige Normalisierung der Superoxidproduktion wird hierdurch jedoch nicht erreicht, was auf eine Beteiligung nicht – endothelialer Superoxidquellen hinweist.

Eine zusätzliche Bosentan – Behandlung konnte zwar die durch NTG gesteigerte Superoxidbildung im Gesamtgefäß nicht normalisieren, hatte aber womöglich günstige Auswirkung auf die Entkopplung der NO – Synthase, indem die antioxidativen Eigenschaften des Endothels zumindest tendenziell wiederhergestellt wurden.

Andererseits zeigte sich in toleranten deendothelialisierten Gefäßringen eine signifikante Steigerung der Sauerstoffradikalbildung unter Bosentan – Behandlung, die auf eine primär nicht – endotheliale Bildungsquelle schließen lässt.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Einleitung

Mit der vorliegenden Studie konnte erstmals in einem Rattenmodell gezeigt werden, dass eine chronische Behandlung mit Nitroglyzerin *in vivo* zur Entwicklung einer Nitrattoleranz und einer endothelialen Dysfunktion führt. Diese geht mit einer gesteigerten überwiegend endothelialen Superoxidbildung einher.

Darüber hinaus demonstriert diese Arbeit eine rezeptor – unabhängig gesteigerte Sensitivität der Rattenaorta gegenüber Vasokonstriktoren unter Nitratbehandlung. Mittels gleichzeitiger oraler Behandlung mit dem Endothelinrezeptorantagonisten Bosentan konnte die abnorme Gefäßreagibilität bei der Nitrattoleranz positiv beeinflusst werden.

Obwohl die Superoxidbildung durch die Bosentanbehandlung im Gesamtgefäß nicht gesenkt werden konnte, ergaben sich Hinweise für eine Verhinderung der toleranzbedingten Entkopplung der endothelialen NO – Synthese als mögliche Erklärung für die verbesserte Endothelfunktion.

### 6.2 Mechanismen der Nitrattoleranz

Die Befunde der vorliegenden Arbeit bestätigen die ersten Beobachtungen, die einen Zusammenhang zwischen Nitrattoleranz, Superoxidproduktion und dem Renin – Angiotensin – Systems beschrieben (Münzel et al. 1995<sup>2</sup>, Münzel et al. 1995<sup>3</sup>, Kurz et al. 1999). Diese Studien wurden mit Kaninchen durchgeführt, die über 3 Tage mit dermalen Nitroglyzerin-Pflastern behandelt wurden.

Die hier vorgestellten Daten zeigen zum ersten Mal, dass ein ähnlicher Zusammenhang auch in aortalen Gefäßen von Ratten nachweisbar ist, die subkutan mit Nitroglyzerin behandelt wurden. Mittlerweile konnten diese Erkenntnisse auf Mausmodelle der Nitrattoleranz (Daiber et al. 2005), aber letztlich auch auf die

klinische Nitrat – Anwendung am Menschen ausgedehnt werden (Schulz et al. 2002).

Die Steigerung des vaskulären oxidativen Stress durch die Dauerbehandlung mit Nitroglyzerin kann potenziell pro – atherogene Veränderungen hervorrufen (Warnholtz et al. 2002).

Eine retrospektive Analyse deutete sogar auf eine Übersterblichkeit von Patienten hin, die nach Myokardinfarkt mit Nitraten behandelt wurden (Nakamura et al. 1999). Diese Erkenntnisse könnten für die beobachtete Abnahme der Verschreibungshäufigkeit organischer Nitrate verantwortlich sein, obwohl die antiischämischen Wirkungen bei der Akut – Behandlung der stabilen oder instabilen Angina pectoris unbestritten sind.

Andererseits zeigen Daten der VheFT I (Cohn et al. 1986) und A – HeFT (Taylor et al. 2004) Studien, dass eine Nitratbehandlung mit Isosorbiddinitrat (ISDN) in Kombination mit dem Antioxidanz und Vasodilatator Dihydralazin zu einer signifikanten Mortalitätssenkung bei Patienten mit Herzinsuffizienz führte.

Aus Tierexperimenten gibt es Hinweise dafür, dass dieses Ergebnis auf eine positive, antioxidative Einwirkung von Dihydralazin auf die Nitrattoleranz zurückzuführen ist (Daiber et al. 2005<sup>2</sup>).

Trotz der hiermit verdeutlichten klinischen Relevanz der Nitrattoleranz sind ihre zugrundeliegenden Mechanismen weiter unzureichend definiert. Als sicher kann gelten, dass die Nitrattoleranz ein multifaktorielles Geschehen darstellt: Wie anfangs dargestellt, zählen hierzu Vorgänge wie neurohumorale Gegenregulation und Plasmavolumenanstieg (Parker JD et al. 1991), die nicht primär vaskulärer Genese sind und deshalb als Pseudotoleranz bezeichnet werden.

Direkt intravaskuläre Mechanismen, die zu einem Wirkungsverlust von Nitroglyzerin führen, werden unter dem Begriff der echten vaskulären Toleranzentwicklung subsummiert. Hierzu gehören eine erhöhte Superoxidanionen – Produktion mit einer verminderten Verfügbarkeit von NO (Münzel et al. 1995<sup>2</sup>) und eine

Hypersensivität gegenüber Vasokonstriktoren (Heitzer et al. 1998), die sich *in vitro* und *in vivo* demonstrieren lassen.

Anfang der 90er Jahre gelangte der Ansatz der neurohumoralen Gegenregulation zu einer dominierenden Stellung (Parker JD et al. 1991, Parker JO et al. 1992). Der nitratinduzierte Blutdruckabfall führt zu einer Aktivierung der Barorezeptoren, die eine Reihe von neurohumoralen Reaktionen nach sich zieht. So kommt es zu einem Anstieg der Katecholaminspiegel (Stewart et al. 1986), des Plasmaspiegels von Vasopressin, der Plasmaaktivität von Renin und zu einer Erhöhung der Aldosteronkonzentration (Parker JD et al. 1991; Münzel et al. 1996<sup>2</sup>). Als Folge der Aldosteronerhöhung kommt es zu einer Natrium – und Wasserretention, die zusammen mit transvaskulären Flüssigkeitsverschiebungen in einem Plasmavolumenanstieg mit Hämatokritabfall münden (Dupuis et al. 1990). Diese konzentrationsabhängigen Veränderungen sind allerdings nicht NTG – spezifisch und treten auch bei der Therapie mit anderen Antihypertonika auf.

Außerdem konnten durch Untersuchungen an epikardialen Gefäßen von Hunden Diskrepanzen in der zeitlichen Abfolge von neurohumoraler Gegenregulation und dem Verlust des vasodilatatorischen Effektes von NTG aufgedeckt werden. So waren die Koronararterien zu einem Zeitpunkt maximaler Renin – Plasmaaktivität durch NTG noch vollständig dilatiert, während die Toleranz unter wieder normalisierten Reninspiegeln auftrat (Münzel et al. 1996<sup>3</sup>).

Diese Befunde deuten darauf hin, dass der Wirkungsverlust von NTG seinen Ursprung in den Gefäßen selbst haben muss, und dass die neurohumorale Aktivierung als alleinige Ursache der Nitrattoleranz unwahrscheinlich ist.

In dem folgenden Teil werden die traditionellen Hypothesen zur Erklärung der „echten“ vaskulären Toleranz zusammengefasst.

Das Konzept einer Sulfhydrylgruppen – (SH – Gruppen) Depletion wurde bereits vor mehr als 25 Jahren von Needleman und Johnson postuliert. Nitrate reagieren hierbei mit SH – Gruppen (sog. Nitro – Rezeptor) unter Bildung von Disulfidbrücken zu S – Nitrosothiolen, wobei man damals bereits annahm, dass

die Toleranz eine Folge der Konfigurationsänderung dieser Reaktionspartner sei (Needleman et al. 1973<sup>1</sup>, 1973<sup>2</sup> und 1976).

Die traditionellen Konzepte der vaskulären Nitratoleranz verloren durch mehrere experimentelle Befunde zunehmend an Bedeutung: So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die *in vivo* Behandlung mit hochdosiertem NTG nicht zu signifikanten SH – Gruppen – Veränderungen führt (Laursen et al. 1996).

Der Ansatz, dass das Zielenzym Guanylatcyclase während chronischer Nitrattherapie desensibilisiert wird, basierte auf Beobachtungen der Arbeitsgruppe von Murad, mit denen in nitratolerantem Gewebe eine Kreuztoleranz zwischen endothelabhängigen und endothelunabhängigen Nitrovasodilatoren, sowie eine verminderte Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) nach NTG – Applikation gezeigt werden konnte (Molina et al. 1987).

Die Hypothese des gesteigerten cGMP – Abbaus als Folge einer erhöhten Phosphodiesteraseaktivität stützt sich auf Untersuchungen, in denen demonstriert werden konnte, dass Nitratoleranz durch die Hemmung des Enzyms korrigierbar ist (Silver et al. 1991). Außerdem wurde beobachtet, dass Toleranz gegenüber Nitroglyzerin mit verringerten cGMP – Antworten und einem veränderten cGMP – Umsatz einhergeht (Axelson et al. 1983).

Des Weiteren wird durch die Beobachtung, dass die Toleranz durch das Entfernen des Endothels fast komplett zu korrigieren ist, eine Desensibilisierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) des glatten Gefäßmuskels als massgebliche Ursache des Wirkungsverlustes von NTG bei chronischer Gabe unwahrscheinlich (Münzel et al. 1995<sup>2</sup>; Laursen et al. 1996).

Diese Argumente führten zur Formulierung neuer Hypothesen zur Entstehung von Nitratoleranz: Dem oxidativen Stress-Konzept, auf das im Folgenden eingegangen wird.

### 6.3 Nitrattoleranz, Superoxidanionen – Produktion und endotheliale Dysfunktion

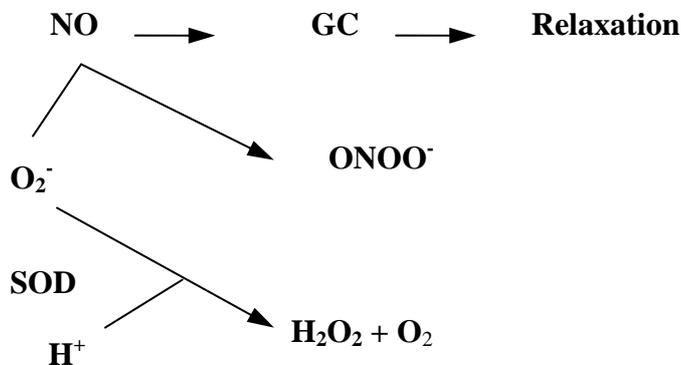
In der hier dargestellten Studie konnten frühere Beobachtungen in einem neuen Ratten – Tiermodell bestätigt werden, dass die experimentelle Induktion einer Nitrattoleranz mit einer Verdopplung der vaskulären Superoxidproduktion einhergeht. Diese Steigerung des oxidativen Stress durch NTG – Dauerbehandlung wurde zunächst im Kaninchenmodell und später auch in menschlichen Gefäßen beschrieben (Münzel et al. 1995<sup>3</sup>, Schulz et al. 2002). Zusätzlich konnte die oxidative Genese der damaligen Beobachtungen weiter dadurch erhärtet werden, dass eine Vorinkubation mit Superoxid – Dismutase (SOD) die  $O_2^-$  – Konzentration und die Abschwächung der NTG – induzierbaren Vasodilatation wieder normalisierte (Münzel et al. 1995<sup>3</sup>).

Interessanterweise konnten ähnliche Effekte ebenfalls durch die Entfernung der endothelialen Zellschicht erzielt werden. Passend hierzu konnten Parker und Mitarbeiter zeigen, dass im Tiermodell, in dem über drei Tage mit NTG behandelt wurde, intakte Aortensegmente einen höheren Toleranzgrad auf NTG nachweisen liessen im Vergleich zu Aortensegmenten ohne Endothel (Parker JD et al. 1995).

In Analogie zu den genannten Kaninchenmodellen führte in der vorliegenden Studie die Entfernung des Endothels zumindest zu einer wesentlichen Verringerung der  $O_2^-$  – Produktion in toleranten Aortenringen. Dieser Befund deutet auf das Endothel als wichtige  $O_2^-$  Quelle hin. Dagegen führt in nicht – toleranten Gefäßen die Endothelentfernung zu einer Erhöhung des Lucigenin verstärkten Chemilumineszenz (LICL) – Signals, was als Ausdruck der basalen endothelialen NO – Freisetzung gewertet werden kann. Das Endothel besitzt somit unter physiologischen Bedingungen antioxidative Potenz, indem endotheliales NO Superoxid neutralisieren kann.

Es wurde bereits früh postuliert, dass das Endothel entweder einen Vasokonstriktor bildet oder dass aus NTG freigesetztes NO chemisch inaktiviert wird bevor es die sGC stimulieren kann.

Folgender möglicher Weg der NO – Inaktivierung wird hierfür beschrieben: NO reagiert mit endothelial gebildetem  $O_2^-$  zum hochreaktiven Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), welches im Gegensatz zu NO keine wesentliche Stimulierung der Guanylatcyclyase hervorruft. Peroxynitrit seinerseits hat eine wesentlich kürzere Halbwertszeit und wirkt über zahlreiche unspezifische Reaktionen zytotoxisch. Die Reaktionsrate für  $O_2^-$  und NO ist dreimal höher als diejenige für  $O_2^-$  und die Superoxid – Dismutase (SOD), welche die Superoxidanionen neutralisiert, indem es  $O_2^-$  zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid abbaut (Radi et al. 1991; White et al. 1994).



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Interaktion zwischen  $O_2^-$  und NO. (NO = Stickstoffmonoxid, GC = Guanylatcyclyase,  $ONOO^-$  = Peroxynitrit, SOD = Superoxid – Dismutase,  $H_2O_2$  – Wasserstoffperoxid,  $O_2$  = Sauerstoff,  $O_2^-$  = Superoxidanionen).

Als endotheliale Superoxidquellen kommen u.a. mitochondriale Enzymsysteme, aber auch NAD(P)H – Oxidasen sowie die endotheliale NO – Synthase in Betracht. Eine systematische Charakterisierung der endothelialen Superoxidquellen im verwandten Rattenmodell war nicht Gegenstand der Untersuchung.

In früheren Studien konnten NAD(P)H – abhängige Oxidasen als Ursprung erhöhter  $O_2^-$  Konzentrationen ausgemacht werden (Münzel et al. 1995<sup>1</sup>; Münzel et al. 1996<sup>1</sup>), indem Hemmstoffe der Flavoproteinoxidasen (Diphenyleniodonium),

anderer flavoproteinhaltiger Oxidasen oder der endothelialen NO – Synthase eingesetzt wurden.

Der Mechanismus, über den die chronische NTG – Therapie zur Aktivierung dieser Enzymsysteme führt ist noch unklar, schliesst möglicherweise aber eine Beteiligung von neurohumoralen Stimuli mit ein.

So konnte beispielweise gezeigt werden, dass Angiotensin II NAD(P)H – abhängige Oxidasen aktiviert (Griendling et al. 1994) und auf diese Weise die Superoxid – anionen – Produktion anregt durch Aktivierung des lokalen Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems (RAAS) (Rajagopalan et al. 1996).

Neben einer gesteigerten Superoxid – Produktion kann dagegen auch eine verminderte Aktivität und Expression des O<sub>2</sub>- abbauenden Enzyms Cu/Zn – SOD für erhöht gemessene Sauerstoffradikale verantwortlich sein (Münzel et al. 1999).

Die vorliegende Arbeit bestätigt aktuelle Befunde, die zeigen, dass eine chronische Behandlung mit NTG – Pflastern oder Infusionen zur Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion, der sog. „Kreuztoleranz“, führt, die bereits in verschiedensten experimentellen Modellen sowie in menschlichen Gefäßen beobachtet werden konnte (Münzel et al. 2000, Schulz et al. 2002, Münzel et al. 2005).

Verantwortlich für die Entstehung der Endotheldysfunktion erscheint ebenfalls die gesteigerte endotheliale Produktion freier Sauerstoffradikale, die zu einer Inaktivierung nicht nur von exogen zugeführtem NO durch Nitrate, sondern auch von endogenem freiem NO führen („Oxidatives Stress – Konzept“). Dies führt zu einer verminderten NO – Bioverfügbarkeit, wobei die vaskuläre NO – Produktion selbst nicht eingeschränkt, sondern im Gegenteil, sogar erhöht sein kann (Münzel et al. 2000). Somit erscheint das Gleichgewicht zwischen NO – Produktion einerseits und der Inaktivierung durch Superoxidanionen (O<sub>2</sub>-) andererseits im Zustand der Nitrattoleranz zur vermehrten NO – Inaktivierung hin verschoben zu sein.

Neben den membranständigen NAD(P)H – Oxidasen kommt der endothelialen NO – Synthetase (eNOS) eine Bedeutung als O<sub>2</sub>- Quelle im Zustand der Nitrattoleranz

zu: Neuere Befunde zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen das Enzym, das eigentlich für die NO – Produktion verantwortlich ist, die Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) generieren kann. Dieses Phänomen wird als „eNOS – Entkopplung“ bezeichnet. Als möglicher molekularer Mechanismus konnte aufgezeigt werden, dass die gleichzeitige NO und  $O_2^-$  Produktion bei der Nitrattoleranz in der Bildung von Peroxynitrit resultiert. Als stark oxidatives Agens, kann Peroxynitrit z.B. den eNOS – Kofaktor  $BH_4$  (Tetrahydrobiopterin) zu  $BH_2$  oxidieren (Laursen et al. 2001), wodurch die Entkopplung der eNOS begünstigt und ein circulus vitiosus aufrecht erhalten wird. Im Zustand der Entkopplung werden die fließenden Elektronen vom reduzierenden zum oxidierenden Zentrum der eNOS abgelenkt und dabei auf molekularen Sauerstoff und nicht auf das eigentliche Substrat L – Arginin übertragen, was zu einer Bildung von Superoxid anstelle von NO führt (Vasquez – Vivar et al. 1998; Xia et al. 1998). Der Nachweis einer eNOS – Entkopplung konnte bei experimenteller Nitrattoleranz sowohl unter *in vitro* – als auch unter *in vivo* – Bedingungen demonstriert werden (Münzel et al. 2000).

Frühere Untersuchungen konnten darüber hinaus zeigen, dass der wesentliche Anteil der bestimmten endothelialen Superoxidproduktion auf den eNOS – Inhibitor L – NMA sensibel ist und somit die entkoppelte eNOS als hauptsächliche endotheliale Superoxidquelle gelten kann (Münzel et al. 2000).

Indirekt kann man daher schließen, dass die gesteigerte endotheliale Superoxidproduktion in den nitrattoleranten Versuchstieren der vorliegenden Studie am ehesten auf eine eNOS – Entkopplung zurückzuführen ist. Die Entwicklung dieser eNOS – Entkopplung wird durch eine gleichzeitige Bosentanbehandlung günstig beeinflusst, da die Endothelentfernung in diesen Aortenringen zu einem gesteigerten Superoxidnachweis führt, d.h dass durch die Bosentan – Behandlung die antioxidative Potenz des Endothels ähnlich den Kontrollbedingungen wiederhergestellt wird.

Wie angedeutet können auch mitochondriale Superoxidquellen zu einer gesteigerten endothelialen Superoxidproduktion beitragen. Kürzlich wurde der Komplex I der mitochondrialen Atmungskette als Superoxidquelle bei der Nitrattoleranz

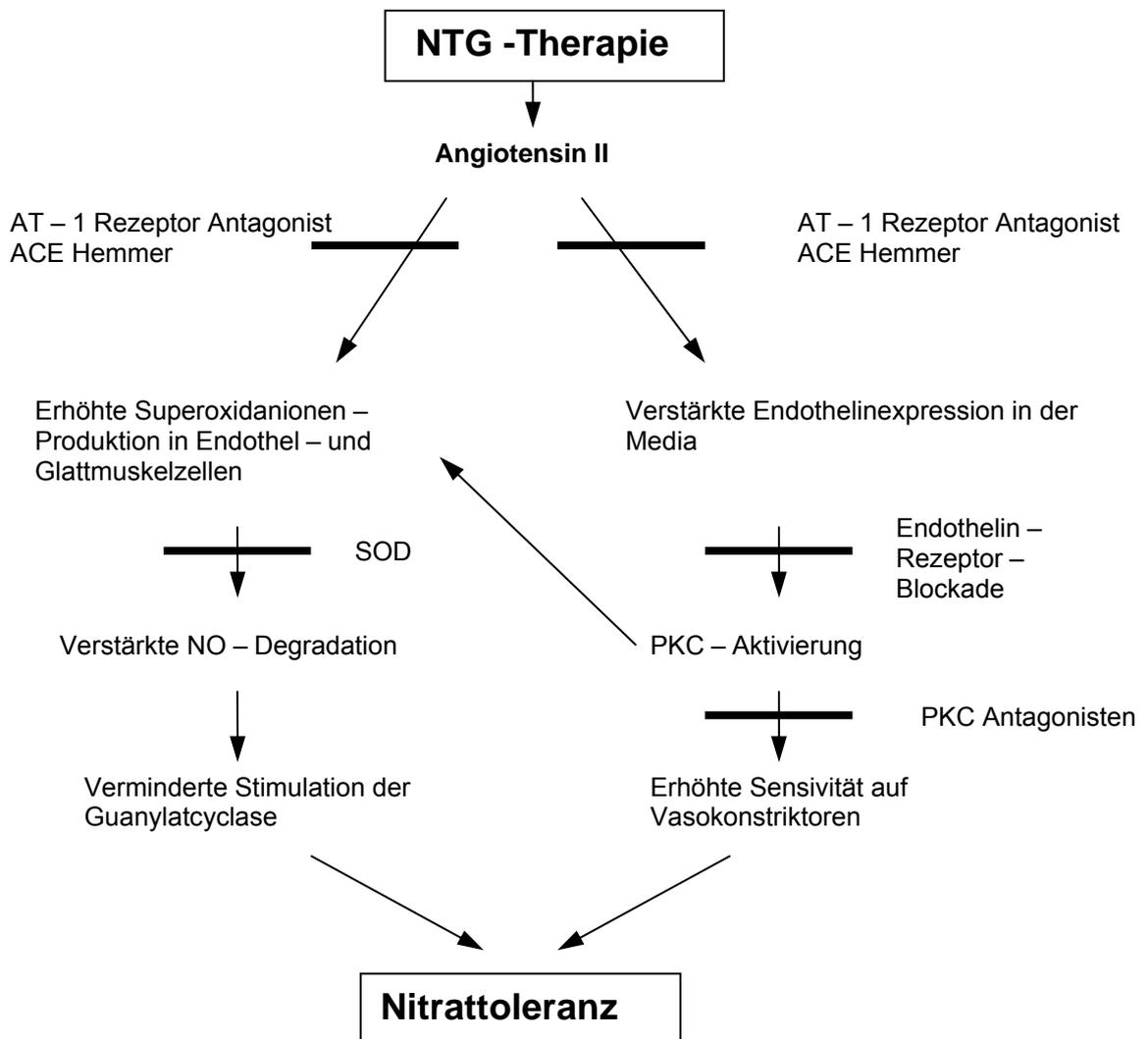
beschrieben (Esplugues et al. 2006). Durch den damit gesteigerten oxidativen Stress können mitochondriale Enzyme in ihrer Funktion moduliert werden.

Für die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH – 2) wurde eine solche oxidative Hemmung bei der Nitrattoleranz beschrieben. Die ALDH – 2 wurde erst vor Kurzem als entscheidendes Enzym bei der Bioaktivierung hochpotenter Nitrate in niedrigen Dosen beschrieben (Chen et al. 2002, Chen et al. 2005). Eine Hemmung dieses Enzyms durch eine Dauerbehandlung mit Nitraten kann ein entscheidender Mechanismus bei der Nitrattoleranzentstehung darstellen, indem die Nitroglyzerin – Bioaktivierung vermindert wird, was durch eine verringerte ALDH – 2 Expression im nitrattoleranten Tiermodell (Szocs et al. 2007) zusätzlich beeinträchtigt werden kann.

Anzeichen für eine herabgesetzte Biotransformation der organischen Nitrate ergaben sich bereits Anfang der neunziger Jahre in intakten Organen sowie in Zellkulturen (Chung et al. 1990; Feelisch et al. 1991, Forster et al. 1991; Salvemini et al. 1992). Nach einer *in vitro* Inkubation mit NTG war dabei die endotheliale und die glattmuskuläre NO – Produktion, genau wie die Vasodilatation auf organische Nitrate, abgeschwächt. Bei der Bioaktivierung von NTG kommt es neben der Reduzierung des Nitrats gleichzeitig zur Hemmung der ALDH – 2 durch eine oxidative Disulfidgruppen – Bildung im Bereich des aktiven Zentrums des Enzyms, die mit Hilfe des Thiolgruppenspendors Dithiothreitol (DTT) *in vitro* aufgehoben werden kann (Wenzel et al. 2007). Andererseits hatte die intravenöse Thiolgruppen – Behandlung keinen Effekt auf die epikardiale Vasodilatation nitrattoleranter Hunde (Münzel et al. 1989).

Durch den Ansatz von spin – trapping – Technik (ESR) konnten Laursen et al. 1996 keine Herabsetzung der Konversion von NTG zu NO *in vivo* in Arterien und Venen bei der Nitrattoleranz nachweisen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das freie Radikal NO nur bei Einsatz suprpharmakologischer NTG – Dosen in Gefäßproben zu detektieren ist, jedoch der vasodilatatorische Effekt von NTG in physiologischen Konzentrationen vor allem durch intermediäre NO – Abkömmlinge vermittelt ist (Kleschyov et al. 2003).

Die gesteigerte Superoxidproduktion in Aorten von nitrtoleranten Ratten ging nicht nur mit einem verminderten Ansprechen auf die Vasodilatoren NTG und Azetylcholin einher, sondern war auch mit einer gesteigerten vasokonstriktori-schen Antwort vergesellschaftet, auf die im Folgenden eingegangen wird.



**Abbildung 13:** Möglicher Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die Entstehung von förderlichen Ereignissen für die Entwicklung der Nitrattoleranz. (AT – 1= Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1, ACE= Angiotensin converting enzyme, SOD= Superoxid – Dismutase, PKC= Proteinkinase C)

#### 6.4 Rolle der Proteinkinase C und des Endothelin – 1 in der Nitrattoleranz

Traditionelle Erklärungen der Nitrattoleranz konzentrierten sich auf Mechanismen mit verminderter vasodilatatorischen Antwort auf NTG nach verlängerter Behandlung mit organischen Nitraten.

Weit weniger Beachtung ist der potentiellen Rolle einer gesteigerten Sensivität gegenüber Vasokonstriktoren zugekommen.

Frühere Studien mit hochdosiertem NTG zeigen eine Zunahme der Sensivität auf  $\alpha_1$  – adrenerg Rezeptor – vermittelte Kontraktionen auf Epinephrin und Norepinephrin (Rydell et al. 1984). Die Hemmung sympathomimetischer Effekte durch spezifische Rezeptorantagonisten suggerierten dabei einen  $\alpha_1$  – adrenerg Rezeptor – vermitteltes Phänomen.

Später zeigte sich jedoch eine rezeptorunabhängig gesteigerte Sensivität gegenüber Vasokonstriktoren, wie zum Beispiel gegenüber Serotonin oder Kaliumchlorid (Münzel et al. 1995<sup>3</sup>). Diese Steigerung der Sensivität von nitrattoleranten Aortensegmenten konnte neben Serotonin auch im weiteren gegenüber den Vasokonstriktoren Angiotensin II und Phenylephrin nachgewiesen werden (Heitzer et al. 1998). Die Dosiswirkungskurven für Angiotensin II, Phenylephrin, Serotonin und KCl zeigten nicht nur eine signifikante Linksverschiebung, sondern damit einhergehend eine gesteigerte Superoxidanionenproduktion – erfasst mittels lucigenininduzierter Chemilumineszenz (Münzel et al. 1995<sup>3</sup>).

Hierfür wurde ein gemeinsamer, intrazellulärer, rezeptorunabhängiger Prozess bzw. eine gemeinsame intrazelluläre Aktivierungskaskade verschiedener Rezeptoren postuliert. Die Proteinkinase C (PKC) könnte dabei eine entscheidende Bedeutung besitzen (Andrea et al. 1992). Die Beobachtung, dass phenylephrininduzierte Konstriktionen langanhaltend und refraktär gegen wiederholtes Auswaschen aus dem Organbad sind, deutete indirekt auf eine Beteiligung der PKC hin, da solche Veränderungen typischerweise über diese vermittelt werden (Andrea et al. 1992).

Im Folgenden konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PKC sich sowohl auf die gestörte Vasoreaktivität als auch auf die gesteigerte Superoxidbildung bei der Nitrattoleranz positiv auswirkt (Münzel, Harrison 1997, Münzel et al. 2000).

Das Konzept wurde durch die Beobachtung bestärkt, dass ein direkter Stimulator der Proteinkinase C (Phorbol-12, 13-dibutyrat) die vasokonstriktorische Hypersensitivität der toleranten Gefäßmuskulatur nachahmen konnte, und dass diese Hypersensitivität gegenüber vasokonstriktorisches Einflüssen mittels einer Inkubation mit Calphostin C, einem PKC – Hemmstoff komplett inhibiert werden konnte. Die PKC – Aktivierung bei der Nitrattoleranz ergab neben einer verstärkten vasokonstriktorischen Komponente auch Hinweise für eine kausale Rolle bei der Entkopplung der NO – Synthase (Münzel et al. 2000): Die *in vitro* Inkubation von nitrattolerantem Aortengewebe mit einem PKC – Inhibitor verbesserte die Vasoreaktivität bei der Nitrattoleranz (endothelunabhängig) und Kreuztoleranz (endothelabhängig) u.a. durch eine Reduktion der NO – Synthase – induzierten Superoxidproduktion. Zierhut et al. 1996 beschreiben sogar eine völlige Aufhebung der verschlechterten Vasodilatationsfähigkeit bei Nitrattoleranz nach Gabe eines PKC – Inhibitors, wobei dessen Effekte auf die NOS – Entkopplung nicht direkt untersucht wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit diesen genannten Beobachtungen überein: Es zeigte sich im Rattenmodell, dass die Ausbildung einer Nitrattoleranz nicht nur zu einer Verschlechterung des Relaxationsverhaltens von Aortenringen führt, sondern auch zu einer rezeptorunabhängigen Hypersensitivität gegenüber dem Konstriktor Kaliumchlorid. Da die Proteinkinase C ein dem Endothelin – Rezeptor nachgeschaltetes Zielenzym darstellt, kann postuliert werden, dass durch die ET – 1 – Blockade durch Bosentan die PKC in ihrer Aktivität gehemmt wird, was zur Aufhebung der vermehrten Vasokonstriktion bei der Nitrattoleranz führen kann.

Entscheidend für die positiven Effekte von Bosentan auf die NTG – Toleranz und ACh – Kreuztoleranz kann darüber hinaus die Aufhebung der endothelialen NOS – Entkopplung durch Bosentan sein, die durch dessen Reduktion der endothelialen

Superoxidproduktion in nitrat-toleranten Gefäßen zum Ausdruck kommt (Abbildung 11).

In diesem Versuch kann die durch Endothelentfernung erzielte Steigerung der Superoxidproduktion in der Kontroll- und NTG+Bos-Gruppe als Hinweis für eine physiologische „Kopplung“ der NO-Synthase gewertet werden, deren basale NO-Freisetzung zu einem Abfangen der vaskulären Superoxids führt, die durch Endothelentfernung demaskiert wird.

Die Versuche demonstrieren, dass die Behandlung mit dem Endothelin-Rezeptor-Antagonist Bosentan die nitrat-induzierte Hypersensitivität gegenüber Vasokonstriktoren und NOS-Entkopplung aufheben kann und sich dadurch positiv auf die gestörte Relaxationsfähigkeit nitrat-toleranter Blutgefäße auswirkt.

In diesem Zusammenhang erschien der Befund einer Abschwächung der durch Endothelin-1 (ET-1) induzierte Vasokonstriktionen in toleranten Aortenringen im Vergleich zu Kontrollgefäßen anfänglich als paradox: Tatsächlich fanden Münzel et al. 1995<sup>3</sup> immunhistochemisch eine deutlich erhöhte Endothelin-1 Konzentration nur in tolerantem Gewebe und schloss daraus auf eine vermehrt endogene Endothelinproduktion. Überraschenderweise waren Kontraktionen induziert durch Endothelin-1, einem klassischen Aktivator der Proteinkinase C, in toleranten Aortenringen im Vergleich zu Kontrollgefäßen abgeschwächt. Eine Erklärung hierfür könnte eine lokale, autokrine Produktion von ET-1 während chronischer Nitratgabe sein, die zu einer Down-Regulation von ET-1-Rezeptoren führt (Clozel et al. 1993) und damit zu einem verminderten Ansprechen auf exogenes ET-1.

Interessanterweise konnte die vaskuläre Hypersensitivität gegenüber Vasokonstriktoren unter 3-tätiger *in vivo* Behandlung mit NTG dadurch imitiert werden, indem eine Inkubation von Kontrollgefäßen mit ET-1 zu gesteigerten Vasokonstriktionen auf Phenylephrin, Angiotensin II, Serotonin und Kaliumchlorid führte (Münzel et al. 1995<sup>3</sup>).

Frühere Daten zeigen, dass diese Beobachtungen auch wichtige klinische Implikationen haben könnten: Heitzer et al. 1995 demonstrierten, dass eine kontinuierliche intravenöse NTG – Behandlung von Patienten mit stabiler Angina pectoris mit einer deutlichen Hypersensivität der Unterarm – Widerstandsgefäße auf Angiotensin II und Phenylephrin assoziiert war.

In der vorliegenden Studie konnte zwar eine rezeptorunabhängige Hypersensitivität für den Vasokonstriktor Kaliumchlorid in nitratoleranten Gefäßen herausgearbeitet werden, bezüglich der Endothelin – 1 – induzierten Vasokonstriktion ergaben sich jedoch – im Gegensatz zu den Beobachtungen von Münzel et al. 1995<sup>3</sup> im Kaninchenmodell – keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll – und Nitrat – behandelten Tieren.

Ob es sich hierbei um Tiermodell – spezifische oder effektive Wirkkonzentrationsunterschiede handeln kann (Applikation von Nitraten via Pflaster bei Kaninchen vs. subkutane Applikation bei Ratten) ist bisher nicht geklärt. Bei höchster ET – 1 – Konzentration zeigten die NTG+Bos – behandelten Tiere sogar eine abgeschwächte Kontraktion gegenüber Kontrollgefäßen, was auf eine evtl. inkomplette Elimination des ET – 1 – Antagonisten zurückgeführt werden kann.

Zusammenfassend führt eine chronische NTG – Behandlung zu einer lokalvaskulären Erhöhung der Endothelin – 1 – Konzentration, die über die Aktivierung der Proteinkinase C eine Hypersensivität gegenüber verschiedenen Vasokonstriktoren vermitteln kann (Münzel et al. 1995<sup>3</sup>).

Interessanterweise sind derartige Veränderungen der Reaktivität auf autokrin produziertes Endothelin für eine Vielzahl von Krankheitsprozessen, wie z.B. Atherosklerose, pulmonale Hypertonie beschrieben worden (Lerman et al. 1991; Giaid et al. 1993), so dass diesen Krankheitsprozessen und der Nitratoleranz bezüglich der Sensivität auf vasokonstriktorische Stimuli gemeinsame Mechanismen zugrunde liegen könnten, die jedoch noch weiterer Charakterisierung bedürfen.

Bezüglich dieser Mechanismen kann jedoch eine sehr enge, lokale Beziehung zwischen dem Endothelin – System und dem Renin – Angiotensin – Aldosteron –

System (RAAS) als sicher gelten: Die Beobachtung, dass Angiotensin II PKC – abhängig über den Angiotensin Typ I Rezeptor (AT – 1) die Expression einer prä – pro – Endothelin – m – RNA induziert (Hahn et al. 1990; Sung et al. 1994) sei hier nur stellvertretend für eine Vielzahl von Interaktionen genannt.

### **6.5 Rolle des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems in der Nitrattoleranz**

Untersuchungen im Kaninchenmodell zeigen, dass die 3 – tägige Dauerbehandlung mit NTG zu einer Steigerung der Plasma – Renin – Aktivität und der vaskulären Expression des Angiotensin II Rezeptors Typ 1 (AT<sub>1</sub>) führt (Kurz et al. 1999). Diese Effekte waren jedoch nach 24 Stunden NTG – Applikation noch nicht nachweisbar und korrelierten somit zeitlich mit dem Wirkverlust von NTG.

Es ist daraus zu schliessen, dass eine systemische und lokale Aktivierung des Angiotensin II – Systems, welche während der *in vivo* Behandlung mit NTG auftritt, eine Schlüsselrolle in der Initiierung weiterer pathophysiologischer Ereignisse spielen kann, die letztlich zur Abschwächung der vasodilatatorischen NTG – Effekte bei längeren Behandlungsperioden führt.

An der frühen Adaptationsphase der Langzeitbehandlung mit NTG sind neurohumorale Änderungen beteiligt, welche die Aktivierung des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems (Packer et al. 1987; Parker JD et al. 1991), die Salz – und Wasserretention und die Zunahme des Intravasalvolumens (Dupuis et al. 1990) beinhalten. Diese beeinflussen u.a. die Vorlast senkenden Effekte der organischen Nitrate. Die Aktivierung des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems ist eine physiologische Antwort auf die (NTG – induzierte) Hypotension und chronische Vasodilatation (Griendling et al. 1994).

Tatsächlich konnte die Rolle des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems in der Entwicklung der Nitrattoleranz nachgewiesen werden durch die Beobachtungen, dass die Hemmung des Angiotensin – Converting – Enzyms die Toleranz verhindern kann (Münzel et al. 1996<sup>3</sup>; Muiesan et al 1993; Mehra et al 1992; Katz et al. 1991; Dakak et al. 1990). Hierfür wurden jedoch hohe Dosen an ACE – Hem-

mern verwandt. Kurz et al. 1999 konnten daraufhin im Tiermodell der Nitrattoleranz gefäßprotektive, dosis – abhängige Effekte des AT<sub>1</sub> – Rezeptorantagonisten Losartan bereits in Dosierungen nachweisen, die im Bereich der klinischen Anwendung lagen.

In Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen, zeigte sich in der Studie von Kurz et al. 1999 eine nach 3 – tägiger NTG – Behandlung gesteigerte Sensivität auf Vasokonstriktoren wie Angiotensin I und Angiotensin II. Die NTG – Behandlung ging ebenfalls mit der Ausbildung einer Nitrattoleranz und Kreuztoleranz auf Acetylcholin sowie einer Verdopplung der vaskulären O<sub>2</sub><sup>-</sup> Produktion einher. Eine Behandlung mit dem AT<sub>1</sub> – Rezeptorantagonist Losartan konnte sowohl die vaskuläre Dysfunktion als auch den gesteigerten oxidativen Stress in diesem Modell positiv beeinflussen.

Analog zur Behandlung mit Losartan wurden einige Kaninchen mit dem ET – 1 – Rezeptorantagonisten Bosentan behandelt, der in diesem Modell ähnliche gefäßprotektive Effekte wie der AT<sub>1</sub> – Rezeptorantagonist – wenn auch in geringerem Ausmass – aufzeigte (Kurz et al. 1999).

Es wurde folglich diskutiert, dass der Endothelin – 1 – Stoffwechselweg zur Pathologie der Nitrattoleranz beiträgt, dass aber darüber hinaus weitere Endothelin – unabhängige Mechanismen zur Nitrattoleranz beitragen.

Diese Befunde werden durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung unterstützt, in der ebenfalls nur eine partielle Aufhebung der abgeschwächten Nitratantwort durch Bosentan – Gabe erzielt werden konnte.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass im Gegensatz zu den mit Losartan erhobenen Befunden weder in dieser Studie noch in der Untersuchung von Kurz et al. 1999 die Dosis – Abhängigkeit der Bosentan – Effekte ermittelt wurde, was letztlich eine Gewichtung der AT<sub>1</sub> bzw. ET – 1 Wirkung erschwert. In jedem Fall bekräftigen diese Befunde die Rolle der PKC als gemeinsame Endstrecke des Angiotensin – und Endothelin – Stoffwechsels bei der Nitrattoleranz.

Im deutlichen Gegensatz zur Studie von Kurz et al. konnte in der vorliegenden Untersuchung durch die Bosentan – Behandlung keine Reduktion der gesamtvaskulären Superoxidproduktion nachgewiesen werden, obwohl in beiden Untersuchungen eine Verbesserung der Gefäßfunktion zu verzeichnen war. Die Ursache hierfür ist unklar, könnte jedoch durch die Wahl des Chemilumineszenz – Verstärkers Lucigenin und durch die unterschiedlichen Tiermodelle begründet sein: Lucigenin verstärkt überwiegend Signale, die extrazellulär entstehen, wobei die Eindringtiefe ins Gewebe ungewiss ist (Skatchkov et al. 1999). Es ist also möglich, dass endotheliale und Adventitia – nahe Signale überproportional verstärkt werden.

Während der positive Bosentan – Effekt auf das Endothel / die endotheliale NO – Synthese durch Endothel – Denudation herausgearbeitet werden konnte, ist ein gegenläufiger Trend im Gefäßmuskel bzw. der Adventitia nicht auszuschließen. Hinzu kommt, dass die extrazelluläre Isoform der Superoxiddismutase (ecSOD) von Ratten im Gegensatz zur ecSOD von Kaninchen nur eine zu vernachlässigende Gewebsbindung aufweist, so dass sich die beiden Tiermodelle nicht nur in Bezug auf die vaskuläre Superoxid – sondern auch Peroxynitrit – Konzentration unterscheiden könnten, die beide mittels Lucigenin – verstärkter Chemilumineszenz nachgewiesen werden können (Skatchkov et al. 1999).

Es erscheint somit möglich, dass Bosentan im vorliegenden Rattenmodell durch die günstigen Effekte auf die NOS – Entkopplung zwar zu einer endothelial verbesserten NO – Bioverfügbarkeit führte, diese sich jedoch nicht auf das vaskuläre Chemilumineszenz – Signal auswirkte. Der komplett normalisierende Effekt von Bosentan auf die endothelabhängige Kreuztoleranz im Gegensatz zum moderaten Effekt auf die Nitrattoleranz der Gefäßmuskels könnten Ausdruck einer endothel – betonten Bosentan – Wirkung sein. Die spezifische Verteilung von ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub> Rezeptoren (s. Einleitung) könnten hierfür von Bedeutung sein.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Inhibierung des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems mit entweder hochdosierten ACE – Hemmern, AT<sub>1</sub> – oder ET – 1 – Rezeptorantagonisten geeignet ist, funktionelle Gefäßverän-

derungen der Nitrattoleranz im Tierversuch zu verhindern oder zumindest günstig zu beeinflussen.

In Übereinstimmung mit früheren Studien unserer Arbeitsgruppe (Münzel et al. 1995<sup>2</sup>; Münzel et al. 1996<sup>1</sup>; Kurz et al. 1999), deutet diese Arbeit auf die ursächliche Rolle des endothelialen oxidativen Stress in der Nitrattoleranz hin und bekräftigt die mechanistische Bedeutung des RAAS und des Endothelin – Systems bei den beobachteten Phänomenen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG UND KLINISCHE BEDEUTUNG

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen einer experimentell hervorgerufenen Nitrattoleranz auf die vaskuläre Superoxidanionen – Produktion, die Entkopplung der endothelialen NO – Synthase und die Gefäßfunktion sowie deren Beeinflussbarkeit durch Hemmung des Endothelin– Systems untersucht.

Hierzu wurde bei männlichen Wistar – Ratten eine Nitrattoleranz durch subkutan implantierte osmotische Minipumpen induziert, die Nitroglyzerin in einer Konzentration von 15 µg / kg / min freisetzen. Nach 3 – tägiger Behandlung entwickelte sich eine Nitrattoleranz, die mit einer gesteigerten vaskulären Superoxidbildung einherging. Eine entkoppelte, dysfunktionelle NO – Synthase kommt als mögliche Quelle der gesteigerten Superoxidproduktion in Betracht.

Die gleichzeitige orale Applikation von Bosentan, einem nicht – selektiven Endothelin – 1 – ET<sub>A</sub> / ET<sub>B</sub> – Rezeptorantagonisten (100 mg / kg / die) führte zu einer signifikanten, partiellen Verbesserung des NTG – induzierten Relaxationsverhaltens in Gefäßringen von nitrattoleranten Tieren.

Die Kreuztoleranz gegenüber dem endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin konnte durch die Bosentan – Behandlung dagegen vollständig aufgehoben werden.

Darüberhinaus konnte das signifikant gesteigerte Konstriktionsvermögen der Gefäßringe von nitrattoleranten Tieren durch gleichzeitige Gabe von Bosentan vollständig normalisiert werden.

Ferner ergaben sich Hinweise für die Normalisierung der NO – Synthase – Funktion toleranter Gefäße unter Endothelin – Rezeptor – Blockade durch Bosentan.

Die Befunde dieser Arbeit lassen darauf schliessen, dass vaskuläre, funktionelle Toleranz – Phänomene zumindest teilweise durch Endothelin – 1 mediiert werden.

Die Zunahme der vaskulären  $O_2$ - Produktion und verstärkter lokaler Endothelin – Konzentrationen unter chronischer Behandlung mit Nitroglyzerin können schädigende, d.h. atherogene Effekte auf die Gefäßwand haben, so dass die Entwicklung effektiver Therapien zur Vermeidung der Nitrattoleranz notwendig sind.

Ob die Hemmung des Endothelin – Stoffwechsels sich als sinnvolles Therapieprinzip bei der klinischen Anwendung von Nitraten erweisen wird, bedarf weiterer Untersuchungen.

## 8 ANHANG

### 8.1 Geräte, Materialien

#### 8.1.1 Geräte

Heizvorrichtung für das Wasserbad :  
Haake C1 (Fisons), HS 89100;  
Fa. Haake, Karlsruhe

Laborwaage:  
Kern 510;  
Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Albstadt

Präzisionswaage:  
Mettler H 51;  
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 Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

Ultrazentrifuge:  
Centrikon T – 2170; Rotor Nr.7 (TFT70.13,S/N 8037);  
Kontron Instruments, Mailand, Italien

Vortexer:  
Eppendorf – Vortexer  
Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

Organbäder:  
Peter Hatch  
University of Iowa, Department of Chemistry, Glasshop  
Iowa City, USA

Haltevorrichtung für Organbadanlage :  
Four position laboratory mount for tissue bath;  
Kent Scientific Cooperation, Lichtfield, Connecticut, USA

Transducer für Organbadanlage:  
Isometric transducer with base amplifier and wall plug-in transformer;

Kent Scientific Cooperation, Lichtfield, Connecticut, USA

Haltevorrichtung für Transducer:

Transducer positioner (for tissue tensioning);

Kent Scientific Cooperation, Lichtfield, 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 Instr. Division, Irvine, California, USA

Reinstwasseranlage:

Reinstwasseranlage Typ Clear;

Wasseraufarbeitungs – und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel

### **8.1.2 Pharmaka und Chemikalien:**

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

- Acetylcholin
- Angiotensin II
- Indometacin
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Lucigenin
- Na – HEPES
- Phenylephrin
- Endothelin

Hoffman – La – Roche, Grenzach – Wyhlen:

- Bosentan, Ro 47 – 0203
- Heparin (Liquemin ®)

G. Pohl – Boskamp GmbH & Co., Hohenlockstedt

- Nitroglycerin (NTG)

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

### 8.1.3 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:	Corel Draw 7.0
Microsoft	MS Word 2000
	MS Excel 5.0
National Institute of Health	NIH Image

**8.1.4 Sonstige Materialien:**

- Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml, Combitips, Pipetten
- Schott Erlenmeyerkolben 100 – 5000 ml, Glaszylinder 500 – 2000 ml,
- Sarstedt Pippetenspitzen 10 – 200 µl, 200 – 1000 µl, 1 – 10 ml, Mikroküvetten
- Packard Econo Glass Vials
- Probengefäße 20 ml mit Schraubenschluß
- Reagenzgläser 10 ml
- Braun: Spritzen, Kanülen

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACE	Hemmer Angiotensin converting enzyme – Hemmer
ACh	Acetylcholin
ALDH – 2	mitochondriale Aldehyddehydrogenase
ANOVA	Analysis of variance
AT – 1	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1
AT II	Angiotensin II
BH <sub>2</sub>	Dihydrobiopterin
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
Ca	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	3', 5', cyclo Adenosinmonophosphat
cGMP	3', 5', cyclo Guanosinmonophosphat
CL	Chemilumineszenz
Cu	Kupfer
DTT	Dithiothreiol
DWK	Konzentrations – Wirkungs – Kurve
ECE	ET – Converting – Enzyme
ecSOD	extrazelluräre Isoform der Superoxiddismutase
ED <sub>50</sub>	halbmaximale Wirkdosis
EDRF	endothelium derived hyperpolarisation factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ESR	spin – trapping – Technik
ET – 1	Endothelin
ET <sub>A</sub>	Endothelinrezeptor A
ET <sub>B</sub>	Endothelinrezeptor B
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm

---

GC	Guanylatcyclase
5 – HT	5 – Hydroxytryptamin=Serotonin
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
HCL	Salzsäure
hv	Lichtquant
IE	internationale Einheiten
IPM	Impulse pro Minute
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KCL	Kaliumchlorid
KH–Puffer	Krebs – HEPES – Puffer
KTR	Kontrolle
l	Liter
LICL	Lucigenin – induzierte Chemilumineszenz
log	negativ dekadischer Logarithmus
M	molar
μ	Mikro
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
max.	maximal
min.	Minuten
ml	Milliliter
mol	Mol
MS	Microsoft
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoffmonoxid

---

NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NTG	Nitroglyzerin=Glyceroltrinitrat
NZWR	New Zealand White Rabbit
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion=Sauerstoffradikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
p	Signifikanz
PC	Personalcomputer
PETN	Pentaerythrityltetranitrat
PETriN	Pentaerythrityltrinitrat
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
RAAS	Renin – Angiotensin – Aldosteron – System
SEM	standard error of the mean
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SH – Gruppen	Sulfhydrylgruppen
SOD	Superoxid – Dismutase
StDev	Standardabweichung
vs.	versus
Zn	Zink

## 10 ABBILDUNGS – UND TABELLENVERZEICHNIS

### Abbildungen

Abbildung 1:	Schema einer Steigerung des oxidativen Stress bei arterieller Hypertonie und Nitrattoleranz. ( $O_2^-$ = Superoxidanion, NO = Stickstoffmonoxid, NAD(P)H = Nicotinamidadeninukleotidphosphat, ET – 1 = Endothelin).....	7
Abbildung 2:	Die Strukturformel von Bosentan. ....	8
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Endothelin – 1 – Stoffwechsels. ....	9
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Der Aortenring ist durch feine Drähte mit dem Kraftumwandler verbunden. So kann jede Veränderung der Gefäßweite registriert werden und per EDV visualisiert und weiterverarbeitet werden. ....	15
Abbildung 5:	Vereinfachtes Messprinzip zur Superoxidanionendetektion im Chemilumineszenzcounter. Der Aortenring schwimmt in dem mit der Verstärkersubstanz Lucigenin angereicherten Krebs – Hepes – Puffer. Die gebildeten Superoxidanionen reagieren mit dem Lucigenin unter Emmission von Lichtquanten (hv), die von einem Detektor registriert und verstärkt werden. Die IPM werden über einen angeschlossenen Drucker aufgezeichnet und dann per EDV weiterverarbeitet. ....	16
Abbildung 6:	Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Nitroglyzerin (NTG) induzierten endothelunabhängigen Vasodilatation in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach kontinuierlicher, dreitägiger NTG – (NTG) oder Nitroglyzerin – und Bosentan – Gabe (NTG + BOS). Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. * indiziert Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe KTR; # indiziert Signifikanz gegenüber der Nitrat- und Bosentan-behandelten Gruppe NTG+Bos.....	21
Abbildung 7:	Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Acetylcholin (ACh) induzierten endothelabhängigen Vasodilatation in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach kontinuierlicher, dreitägiger NTG – (NTG) oder Nitroglyzerin – und Bosentan – Gabe (NTG + BOS). Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. * indiziert Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe KTR; # indiziert Signifikanz gegenüber der Nitrat – und Bosen – tan – behandelten Gruppe NTG+Bos. ....	23
Abbildung 8:	Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Kaliumchlorid (KCl) induzierten rezeptorunabhängigen Vasokonstriktion in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach kontinuierlicher, dreitägiger NTG – (NTG) oder Nitroglyzerin – und Bosentan – Gabe (NTG + BOS). Mittelwerte $\pm$ Standardfehler. * indiziert Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe KTR; # indiziert Signifikanz gegenüber der Nitrat – und Bosentan – behandelten Gruppe NTG+Bos. ....	24
Abbildung 9:	Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Phenylephrin (Phe) induzierten alpharezeptorabhängigen Vasokonstriktion in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach kontinuierlicher, dreitägiger NTG – (NTG) oder Nitroglyzerin – und Bosentan – Gabe (NTG + BOS). Mittelwerte $\pm$ Standardfehler .....	25
Abbildung 10:	Konzentrations – Wirkungs – Beziehung der Endothelin – 1 (ET1) induzierten Endothelin – rezeptorabhängigen Vasokonstriktion in aortalen Segmenten von Kontrolltieren (KTR) bzw. nach	

kontinuierlicher, dreitätiger NTG – (NTG) oder Nitroglyzerin – und Bosentan – Gabe (NTG+BOS). Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler. \* indiziert Signifikanz gegenüber der zwischen NTG+Bos und der Kontrollgruppe KTR im Bezug auf die maximale Kontraktionsantwort. .... 26

Abbildung 11: Superoxidanionen – Bildung von Gefäßringen mit oder ohne Endothel in den Kontrollgruppe (KTR) und den Behandlungsgruppen NTG (Nitroglyzerin für 3 Tage) oder NTG+Bos (Nitroglyzerin und Bosentan für 3 Tage). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler. Signifikante Unterschiede wie angezeigt ( $p < 0,05$ ). .... 27

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen  $1$  und NO. (NO = Stickstoffmonoxid, GC = Guanylatcyclase, ONOO<sup>-</sup> = Peroxynitrit, SOD = Superoxid – Dismutase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Wasserstoffperoxid, O<sub>2</sub> = Sauerstoff, O<sub>2</sub><sup>-</sup> = Superoxidanionen). .... 34

Abbildung 13: Möglicher Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die Entstehung von förderlichen Ereignissen für die Entwicklung der Nitrattoleranz. (AT – 1 = Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1, ACE = Angiotensin converting enzyme, SOD = Superoxid – Dismutase, PKC = Proteinkinase C) .... 38

**Tabellen**

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der isometrischen Reaktivitätsuntersuchungen an aortalen Segmenten in den 3 Behandlungsgruppen ausgedrückt als Potenz (halbmaximale Wirkdosis ED<sub>50</sub>) und Effizienz (maximale relative Relaxation) auf die verschiedenen Vasodilatoren (NTG – Nitroglyzerin; Ach – Acetylcholin) und Vasokonstriktoren (KCl – Kaliumchlorid; Phe – Phenylephrin; ET1 – Endothelin – 1). \* indiziert Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe KTR; # indiziert Signifikanz gegenüber der Nitrat – und Bosentan – behandelten Gruppe NTG+Bos. .... 21

## 11 LITERATURVERZEICHNIS

Alheid U, Reichwehr I, Förstemann U (1989) Human endothelial cells inhibit platelet aggregation by separately stimulating platelet cyclic AMP and cyclic GMP. *Eur J Pharmacol* 164 (1): 103 – 110

Andrea JE, Walsh MP (1992) Protein kinase C of smooth muscle . *Hypertension* 1992; 20: 585 – 95

Axelsson KL, Andersson RG (1983) Tolerance towards Nitroglycerin, induced in vivo, is correlated to a reduced cGMP response and an alteration in cGMP turnover. *European J Pharmacol* 88: 71 – 79

Bassenge E, Busse R (1988) Endothelial modulation of coronary tone. *Prog Cardiovasc Dis* 30: 349 – 380

Bernhardt J, Tschudi MR, Dohi Y, Gut I, Urwyler B, Buhler FR, Luscher TF (1991) Release of nitric oxide from human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 180 (2): 907 – 912 0006 – 291 X

Blasini R, Brüggmann U, Mannes A, Froer KL, Hall D, Rudolph W (1980) Wirksamkeit von Isosorbitdinitrat in retardierter Form bei Langzeitbehandlung. *Herz* 5: 298 – 305

Blasini R, Reiniger G, Brüggmann U (1985) Tolerance to the antiischemic effect of isosorbide dinitrate during continuous but not during intermittent oral therapy. In: Cohn JN, Rittinghausen R (eds): *Mononitrates* Berlin Heidelberg New York Tokyo, Springer 124 – 129

Boesgaard S, Aldershvile J, Poulsen HE, Loft S, Anderson ME, Meister A (1994) Nitrate tolerance in vivo is not associated with depletion of arterial or venous thiol levels. *Circ Res* 74: 115 – 120

Braugher JM (1983) Soluble guanylate cyclase activation by nitric oxide and is reversal. Involvement of sulfhydryl group oxidation and reduction. *Biochem – Pharmacol* 32 (5): 811 – 818

Chen Z, Zhang J, Stamler JS (2002). Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 8306 – 11

Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, Kitagawa K, Nakayama KI, Hess DT, Stamler JS (2005). An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 12159 – 64

Chung SJ, Fung HL (1990) Identification of the subcellular site for Nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 614 – 619

Clozel M et al. (1992) The endothelin ETB receptor mediates both vasodilation and vasoconstriction in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 867 – 873

Clozel M, Löffler BM, Breu V, Hilfiger L, Maire JP, Butscha B (1993) Downregulation of endothelin receptors by autocrine production of endothelin. *Am J Physiol* 265: C 188– C 192

Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1983) Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 1983; 22 : 273 – 4

Cohn JN, Archibald DG, Ziesche JA, Franciosa JA, Harston WE, Tristani FE, Dunkman WB, Jacobs W, Francis GS, Flohr KH, et al. (1986). Effect of vasodilator therapy on mortality in chronic congestive heart failure. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N. Engl. J. Med.* 314 (1986) 1547 – 1552

Cooke JP, Singer AH, Tsao P, Zera P, Rowan RA, Billingham ME (1992) Antithrombotic effects of L – arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest.* 90 (3): 1168 – 1172

Daiber A, Oelze M, Sulyok S, Coldewey M, Schulz E, Hink U, Mulsch A, Scharffetter – Kochanek, Münzel T (2005<sup>1</sup>). Heterozygous deficiency of manga-

nese dismutase in mice (Mn – SOD+/-) : a novel approach to assess the role of oxidative stress for the development of nitrate tolerance. *Mol Pharmacol.* 2005; 68: 579 – 88

Daiber A, Mulsch A, Hink U, Mollnau H, Warnholtz A, Oelze M, Münzel T (2005<sup>2</sup>). The oxidative stress concept of nitrate tolerance and antioxidant properties of hydralazine. *Am J Cardiol.* 2005; 96:25i – 36i

Dakak N, Makhoul N, Flugelman MY, Merdler A, Shehadeh H, Schneeweiss A, Halon DA Lewis BS (1990) Failure of captopril to prevent nitrate tolerance in congestive heart failure secondary artery disease. *Am J Cardiol.* 1990; 66: 608 – 613

D'Andrea G, Cananzi AR, Perini F, Alecci M, Zamberlan F, Hasselmark L, Welch KM (1994) Decreased collagen – induced platelet aggregation and increased platelet arginine levels in migraine: a possible link with the NO pathway. *Cephalalgia* 14: 352 – 356

Dupuis J, Lalonde G, Lemieux R, Rouleau JL (1990) Tolerance to intravenous Nitroglycerin in patients with congestive heart failure: role of increased intravascular volume, neurohumoral activation and lack of prevention with N – acetylcysteine. *J Am Coll Cardiol* 1 : 923 – 931

Elkayam U, Kulick D, McIntosh N, Roth A, Hsueh W (1987) Incidence of early tolerance to hemodynamic effects of continuous infusion of nitroglycerin in patients with coronary artery disease and heart failure. *Circulation* 1987; 76: 577 – 84

Elkayam U, Roth A, Mehra A (1991) Randomized study to evaluate the relation between oral isosorbide dinitrate dosing interval and the development of early tolerance to its effect on left ventricular filling pressure in patients with chronic heart failure. *Circulation* 84: 2040 – 2048

Esplugues JV, Rocha M, Nunez C, Bosca I, Ibiza S, Herance JR, Ortega A, Serrador JM, D'Ocon P, Victor VM (2006). Complex I dysfunction and tolerance to nitroglycerin: an approach based on mitochondrial – targeted antioxidants. *Circ Res.* 2006; 99: 1067 – 1075

Feelisch M, Kelm M (1991) Biotransformation of organic nitrates to nitric oxide by vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 286 – 293

Forster S, Woditsch I, Schröder H, Schrör K (1991) Reduced nitric oxide release causes nitrate tolerance in the intact circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 17: 867 – 872

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

Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F (1991) Isoforms of nitric oxide synthase. Characterisation and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 24: 1849 – 1857

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 (5789): 373 – 376

Garg UC, Hassid A (1989) Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxidegenerating vasodilators. *Am J Physiol* 257: F 60 – 66

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart D (1993) Expression of endothelin – 1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328: 1732 – 1739

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 7 : 1141 – 1148

Gyllenhammer H (1987) Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods* 97: 209 – 231

Hahn AW, Resink TJ, Scott – Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR (1990) Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1: 649 – 659

Harrison DG, Freiman PC, Armstrong ML, Marcus ML, Heistad DD (1987) Alterations of vascular reactivity in atherosclerosis. *Circ Res* 61: II 74 – II 80

Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ (1995) Endothelin ETA and ETB receptors mediate vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation*. 1995; 92: 357 – 363

Heitzer T, Münzel T, Just H (1995) Nitroglycerin induced hypersensitivity to vasoconstrictors is prevented by treatment with ACE – inhibitors (abstract). *Circulation* 92: 1 – 18

Heitzer T, Just H, Brockhoff C, Meinertz T, Münzel T (1998) Chronic angiotensin converting enzyme inhibition with captopril prevents Nitroglycerin induced hypersensitivity to vasoconstrictors in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 27: 297 – 303

Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, Daiber A, Mollnau H, Baldus S, Tsilimingas N, Walter U, Ullrich V, Münzel T (2003). Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42: 1826 – 34

Hosada K, Nakao H, Arai H (1991) Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett*. 1991; 287: 23 – 26

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium – derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *SR – Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265 – 9269

INVESTIGATIONAL DRUG BROCHURE (Sixth Version, July 1997) Bosentan Ro 4 – 0203 Endothelin Receptor Antagonist, Roche

Jordan RA, Seth L, Casebolt P, Hayes MJ, Wilen MM, Franciosa J (1986) Rapidly developing tolerance to transdermal Nitroglycerin in congestive heart failure. *Ann Int Med* 104: 295 – 298

Katz RJ, Levy WS, Buff L, Wassermann AG (1991) Prevention of nitrate tolerance with angiotensin – converting enzyme inhibitors. *Circulation* 91; 83:1271 – 1277

Kleschyov AL et al. (2003) Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res.* 2003; 93 (9): e 104 – 12

Kubes S, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (11):4651 – 4655

Kurz S, Hink U, Nickenig G, Borthayre AB, Harrison DG, Münzel T (1999) Evidence for a Causal Role of the Renin – Angiotensin System in Nitrate Tolerance. *Circulation* 99: 3181 – 3187

Laursen JB, Mülsch A, Boesgard S, Mordvintcev P, Trautner S, Gruhn N, Nielsen – Kudsk JE, Busse R, Aldershvile J (1996) In vivo nitrate tolerance is not associated with reduced bioconversion of Nitroglycerin to nitric oxide. *Circulation* 94

Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG (2001). Endothelial regulation of vasomotion in apoE – deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001; 103: 1282 – 8

Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublin DM, Sandberg SM, Burnett J CJ (1991) Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *New J Med* 32 : 997 – 1001

Liew FY (1995) Interactions between cytokines and nitric oxide. *Adv Neuroimmunol* : 201 – 209

Lüscher TF, Diederich D, Siebenmann R, Lehmann K, Stulz P, Von SL, Yang ZH, Turina M, Grädel E, Weber E, Bühler FR (1988) Difference between endothelium –

dependent relaxation in arterial and in venous coronary bypass grafts. *N Engl J Med* 1988; 319: 462 – 7

Mehra A, Ostrzega E, Shotan A, Johnson JV, Elkayam U (1992) Persistent hemodynamic improvement with short – term nitrate therapy in patients with chronic congestive heart failure already treated with captopril. *Am J Cardiol.* 1992; 70: 1310 – 1314

Molina CR, Andresen JW, Rapoport RM, Waldman S, Murad F (1987) Effect of in vivo Nitroglycerin therapy on endothelium – dependent and independent vascular relaxation and cyclic GMP accumulation in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 10: 371 – 378

Münzel T, Holtz J, Mulsch A, Stewart DJ, Bassenge E (1989) Nitrate tolerance in epicardial arteries or in the venous system is not reversed by N – acetylcysteine in vivo, but tolerance – independent interaction exist. *Circulation* 79 : 188 – 97

Münzel T, Kurz S, Rajagopalan S, Tarpey M, Freeman B, Harrison DG (1995 <sup>1</sup>) Identification of the membrane bound NADH oxidase as the major source of superoxide anion in nitrate tolerance (abstract) *Endothelium* 3 (Suppl): s 14

Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG (1995<sup>2</sup>) Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross – tolerance. *J Clin Invest* 95: 187 – 194

Münzel T, Giaid A, Kurz S, Stewart DJ, Harrison DG (1995<sup>3</sup>) Evidence for a role of endothelin 1 and protein kinase C in Nitroglycerin tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5244 – 5248

Münzel T, Kurz S, Rajagopalan S, Thoenes M, Berrington WR, Thompson JA, Freeman BA, Harrison DG (1996<sup>1</sup>) Hydralazine prevents Nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane – bound NADH oxidase: a new action for an old drug. *J Clin Invest* 98: 1465 – 1470

Münzel T, Heitzer T, Kurz S et al. (1996<sup>2</sup>) Dissociation of coronary vascular tolerance and neurohormonal adjustments during long – term Nitroglyzerin therapy in patients with stable coronary disease. *J Am Coll Cardiol* 1996; 297 – 303

Münzel T, Bassenge E (1996<sup>3</sup>) Long – term angiotensin – converting enzyme inhibition with high – dose enalapril retards nitrate tolerance in large epicardial arteries and prevents rebound coronary vasoconstriction in vivo. *Circulation* 1996; 93 : 2052 – 8

Münzel T, Harrison DG (1997) Evidence for a role of oxygen – derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *J Mol Med* 1997; 75: 891 – 900

Münzel T, Hink U, Yigit H, Macharzina R, Harrison DG, Mulsch A (1999) Role of superoxid dismutase in in vivo and in vitro nitrate tolerance. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1224 – 30

Münzel T, Li H, Mollnau H et al. (2000) Effects of long – term Nitroglyzerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III – mediated superoxide produktion and vascular NO bioavailability. *Circ Res* 2000; 86 (1): E 7 – E 12

Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A (2005). Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP – dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 1551 – 7

Muiesan ML, Boni E, Castellano M, Beschi M, Cefis G, Cerri B, Verdecchia P, Porcellati C, Pollavini G, Agabiti – Rosei E (1993) Effects of transdermal Nitroglyzerin in combination with an ACE – inhibitor in patients with chronic stable angina pectoris. *Eur Heart J.* 1993; 14: 1701 – 1708

Murad F (1994) The nitric oxide – cyclic GMP signal transduktion system for intracellular and intercellular kommunikation. *Recent Prog Horm Res* 49: 239 – 248

Nakamura Y, Moss AJ, Brown MW, Kinoshita M, Kawai C (1999). Long – term nitrate use may be deleterious in ischemic heart disease: A study using the databases from two large – scale postinfarction studies. Multicenter Myocardial Ischemia Research Group. *Am Heart J.* 1999; 138: 577 – 85

Needleman P, Johnson E MJ (1973<sup>1</sup>) Mechanism of tolerance development to organic nitrates. *J Pharmacol Exp Ther* 184: 709 – 715

Needleman P, Jakschik B, Johnson E Jr (1973<sup>2</sup>) Sulfhydryl requirement for relaxation of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 324 – 331

Needleman P, Johnson EM Jr (1976) Sulfhydryl reactivity of organic nitrates: tolerance and vasodilation. In: Bevan et al. (eds) *Vascular neuroeffector mechanism*. Basel, Karger, pp 208 – 215

Niwa Y, Nagata N, Oka M (2000) Production of nitric oxide from endothelial cells by 31 – amino – acid length endothelin – 1, a novel vasoconstrictive product by human chymase. *Life Sci.* 2000; 67: 1103 – 1109

Ogawa Y, Nakao K, Arai H (1991) Molecular cloning of a non – isopeptide – selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 178: 248 – 255

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91: 2546 – 2551

Paakkari I, Lindsberg P (1995) Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med* 27: 369 – 377

Packer M, Lee W, Kessler PD, Gottlieb SS, Medina M, Yushak M (1987) Prevention and reversal of nitrate tolerance in patients with congestive heart failure. *N Engl J Med* 317: 799 – 804

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release acImpulse for the biological activity of endothelium – derived relaxing factor. *Nature* 327: 524 – 526

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L – arginine. *Nature* 333: 664 – 666

Parker JD, Farrel B, Fenton T, Cohan M, Parker JO (1991) Counter – regulatory responses to continuous and intermittent therapy with Nitroglycerin. *Circulation* 84: 2336 – 2345

Parker JD, Parker AB, Farrel B, Parker JO (1995) Intermittent transdermal Nitroglycerin therapy. Decreased threshold during the nitrate free interval. *Circulation* 1995; 91: 973 – 8

Parker JO, Farrel B, Lahey KA, Moe G (1987) Effects of intervals between doses on the development of tolerance to isosorbide dinitrate. *N Engl J Med* 1987: 1440 – 1444

Parker JO, Parker JD (1992) Neurohormonal activation during nitrate therapy : a possible mechanism for tolerance. *Am J Cardiol* 70 : 24

Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F (1991) Purification and characterization of particulate endothelium derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10480 – 10484

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite – induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 481 – 7

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG (1996) Angiotensin II – mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH / NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97: 1916 – 1923

Rapoport RM, Draznin MB, Murad F (1983) Endothelium – dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP – dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983; 306: 174 – 176

Reiniger G, Blasini R, Brüggemann U, Rudolph W (1984) Toleranzentwicklung hinsichtlich der antiischämischen Wirkung von Isosorbiddinitrat bei regelmäßiger, mehrfach täglicher Verabreichung. *Herz* : 146 – 152

Rich S, McLaughlin V (2003) Endothelin Receptor Blockers in Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2003; 108: 2184 – 90

Roth A, Kulick D, Freidenberger L, Hong R, Rahimtoola SH, Elkayam U (1987) Early tolerance to hemodynamic effects of high dose transdermal Nitroglycerin in responders with severe chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 9: 858 – 864

Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM (1986) Flow – induced release of endothelium – derived relaxing factor. *Am – J – Physiol*. 1986 Jun; 250 (6 Pt 2): H 1145 – 9

Rydell EL, Axelsson KL (1984) Adrenaline toxicity in mice: sensitization of alpha 1 adrenoceptors by Nitroglycerin. *Acta Pharmacol Toxicol* 55: 73 – 77

Salvemini D, Mollace V, Pistelli A, Anggard E, Vane J (1992) Metabolism of glyceryl trinitrate to nitric oxide by endothelial cells and smooth muscle cells and its induction by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 982 – 986

Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, Oelze M, Woelken – Weckmüller S, Walter U, Reichenspurner H, Meinertz T, Münzel T (2002). Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation*. 2002; 105: 1170 – 5

Schulz R, Triggle CR (1994) Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol Sci* 15: 255 – 259

Silver PJ, Pagani ED, de – Garavilla L, Van – Aller GS, Volberg ML, Pratt PF, Buchholz RA (1991) Reversal of Nitroglycerin tolerance by the cGMP phosphodiesterase inhibitor zaprinast. *Eur J Pharmacol* 199: 141 – 142

Skatchkov MP, Sperling D, Hink U, Mulsch A, Harrison DG, Sindermann I, Meinertz T, Münzel T (1999). 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

Steward DD (1888) Remarkable tolerance to nitroglycerin. *Philadelphia Polyclinic* 1888; 12

Steward DD (1905) Tolerance to nitroglycerin. *JAMA* 1905; 44: 1678

Stewart DJ, Elsner D, Sommer O, Holtz J, Bassenge E (1986) Altered spectrum of Nitroglycerin action in long – term treatment : Nitroglycerin – specific venous tolerance with maintenance of arterial vasodepressor potency. *Circulation* 7: 573 – 582

Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH (1994) Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 27 : 429 – 437

Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, Ullrich V, Mulsch A, Schulz E, Keaney JF, Jr., Stamler JS, Münzel T (2004). Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross – tolerance. *J Clin Invest.* 2004; 113: 482 – 9

Szocs K, Lasseque B, Wenzel P, Wendt M, Daiber A, Oelze M, Meinertz T, Münzel T, Baldus S (2007). Increased superoxide production in nitrate tolerance is associated with NAD(P)H oxidase and aldehyde dehydrogenase 2 downregulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42: 1111 – 8

Taylor AL, Ziesche S, Yancy P, Carson R, Agostino RD Jr., Ferdinand K, Taylor M, Adams K, Sabolinski M, Worcel M, Cohn JN (2004). Combination of isosorbide dinitrate and hydralazine in blacks with heart failure. *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 2049 – 2057

Vasquez – Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters Bss, Karoui H, Tordo P, Pritchard Ka Jr. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 9220 – 9225

Warnholtz A, Mollnau H, Heitzer T, Kontush A, Moller – Bertram T, Lavall D, Giaid A, Beisiegel U, Marklund SL, Walter U, Meinertz T, Münzel T (2002). Adverse effects of nitroglycerin treatment on endothelial function, vascular nitrotyrosine levels and cGMP – dependent protein kinase activity in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 40: 1356 – 63

Wenzel P, Hink U, Oelze M, Schuppan S, Schaeuble K, Schildknecht S, Ho KK, Weiner H, Bachschmid M, Münzel T, Daiber A (2007). Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH – 2) activity. Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J Biol Chem.* 2007; 282: 792 – 9

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

Wolfe TA, Dasta JF (1995) Use of nitric oxide synthase inhibitors as a novel treatment for septic shock. *Ann Pharmacother* 29: 36 – 46

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

Yanagisawa M, Kurikara H, Kimura S (1988) A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411 – 415

Zierhut W, Ball HA (1996) Prevention of vascular Nitroglycerin by inhibition of protein kinase C. Br J Pharmacol 119: 3 – 5

## **12 LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf entfällt aus Datenschutzgründen.

### 13 DANKSAGUNG

Für die stetige, wertvolle und geduldige Betreuung und Unterstützung möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Münzel (Abteilung für Kardiologie, Universitätskrankenhaus Hamburg – Eppendorf) bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit unentbehrlich war. Sein Ideenreichtum und seine unkomplizierte, freundliche Hilfsbereitschaft, die sich bei Weitem nicht nur auf das Wissenschaftliche beschränkte, waren entscheidend für einen reibungslosen Ablauf der Experimente und eine entspannte Atmosphäre.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Meinertz (Direktor der Abteilung für Kardiologie, Universitätskrankenhaus Hamburg – Eppendorf), der überhaupt den Rahmen meiner Arbeit ermöglicht hat.

Ohne PD Dr. Ulrich Hinks organisatorisches und humoristisches Talent und deren aufopfernden Einsatz für wissenschaftliche Präzision wäre eine Durchführung dieser Studie nicht denkbar gewesen. Besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Ulrich Hink für die Durchsicht und Korrekturen dieser Arbeit.

Ebenfalls unentbehrlich war die erfrischende Zusammenarbeit mit Gudrun Willy, mit der ich jeden Handgriff und jeden Quadratcentimeter am gemeinsamen Arbeitsplatz teilte. Die gemeinsame Sorge um den Erfolg dieser Studie und um die gute Stimmung in der Arbeitsgruppe, schafften eine motivierende und familiäre Atmosphäre.

Meinem Lebensgefährten, Timo Gerbes, danke ich für seine motivierende Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

## 14 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.

Alina Gerbes