

**Experimentelle Untersuchungen zum
molekularen Mechanismus der
Monozyten-Endothelzell-Interaktion
durch Salicylsäurederivate in vitro**

vom Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation von
Guido Wohlers
geboren am 10.08.1971 in Oldenburg

Hamburg 2001

1. Gutachter Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

2. Gutachter Prof. Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Duchstein

Tag der Disputation: 19. November 2001

Kurzfassung

Ein früher und entscheidender Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose ist das „Rollen“ von Monozyten an der Endothelzelloberfläche und die Adhäsion der Monozyten an den Endothelzellen. Die Adhäsion von Monozyten wird vermittelt über Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1), die an der Zelloberfläche der Endothelzellen exprimiert werden. Die Expression wird ihrerseits über eine Kaskade von Zytokinen gesteuert. Bei der Aktivierung spielt das Sauerstoffradikal $O_2^{\bullet -}$ und der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine entscheidende Rolle. Ein Abfangen der Sauerstoffradikale durch Antioxidantien bzw. eine Hemmung des Transkriptionsfaktors vermindert die Expression von VCAM-I und reduziert somit die Zahl adhärrierender Monozyten.

Für Salicylate wurde bereits eine hemmende Wirkung auf die Aktivierung von NF- κ B beschrieben.

Ebenso wurden schon antioxidative Effekte von Salicylaten formuliert, die nicht allein mit einer Hemmung der Cyclooxygenase erklärt werden können.

In der hier vorliegenden Studie wurden die Effekte von Ibuprofen, Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und dem NO $^{\bullet}$ -freisetzendem ASS-Derivat NCX-4016 auf die Adhäsion von Monozyten an stimulierten Endothelzellen, die Bildung von VCAM-I und die Bildung von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ als Indikator für oxidativen Stress untersucht. Desweiteren wurden die Einflüsse der Salicylate auf die NF- κ B-Aktivierung und die Ferritin-Bildung eruiert.

Die Adhäsionsversuche erfolgten als in-vitro-Versuch mit einer kultivierten humanen Endothelzelllinie (ECV-304) und Monozyten der humanen Zelllinie THP-I.

Die Endothelzellen wurden mit TNF- α (200 U/ml), oxLDL (30 mg/dl) oder nLDL (300 mg/dl) stimuliert und danach mit den Monozyten für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluß wurden die nach Waschen verbliebenen Monozyten bildanalytisch quantifiziert. Die Adhäsion von Monozyten an das stimulierte Endothel wurde durch alle Salicylsäurederivate konzentrationsabhängig negativ beeinflusst. Die Wirkung in Konzentrationen von 0,5 bis 1 mM war vergleichbar mit den Effekten, die auch die Antioxidantien Vitamin C und Vitamin E hatten. Ibuprofen hatte auf die Monozytenadhäsion keinen hemmenden Effekt.

Durch Salicylate wurde auch die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-I - gemessen mit Hilfe eines ELISA - vermindert, während Ibuprofen keinen Einfluß auf die Expression hatte.

Die Freisetzung des 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ aus mit nLDL stimulierten Endothelzellen wurde durch die Salicylate ASS und NCX-4016 konzentrationsabhängig hemmend beeinflusst. 8-iso-PGF $_{2\alpha}$

kann als ein Marker für oxidativen Streß angesehen werden, da es nichtenzymatisch durch Sauerstoffradikale gebildet wird. Durch eine Inkubation mit Ibuprofen wurde dagegen die Freisetzung des auf oxidativem Wege gebildete Isoprostans nicht reduziert.

Die durch LDL stimulierte redoxsensitive NF- κ B-Aktivierung aus Endothelzellen wurde durch alle Salicylate in 1 mmolarer Konzentration genauso stark gehemmt wie durch 0,1 mM des NF- κ B-Inhibitors Pyrrolidindithiocarbamat. Ibuprofen zeigte auch hier keinerlei hemmende Wirkung.

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, daß Salicylate im Gegensatz zu Ibuprofen die Adhäsion von Monozyten an das stimulierte Endothel über einen antioxidativen Mechanismus beeinflussen.

Abstract

Early and important steps in the initiation and progression of atherosclerosis are the rolling of monocytes on the endothelial cell surface and the adhesion to the endothelium. The adhesion is mediated between monocyte adhesion molecules and endothelial adhesion molecules (VCAM-I, ICAM-I), which are expressed at the cell surface. The expression of these molecules is controlled by a cascade of cytokines. At the activation the oxygen radical O_2^{\bullet} and the transcription factor NF- κ B play an important role. A scavenging of oxygen radicals by antioxidants or an inhibition of the activation of NF- κ B leads to a reduction of the expression of VCAM-I and lessens the number of adhering monocytes.

An inhibiting effect of the activation of NF- κ B-activation by salicylates was already described.

An antioxidative property of salicylates, which can not be related to the inhibition of cyclooxygenase, was described as well.

In this study the effects of ibuprofen, salicylic acid, acetylsalicylic acid and the NO $^{\bullet}$ -releasing derivative NCX-4016 on the adhesion of monocytes to stimulated endothelial cells, the expression of VCAM-I and the release of 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$, an indicator of oxidative stress, were investigated. In addition the influence of salicylates on NF- κ B-activation and the ferritin-release was researched.

The adhesion experiments were carried out as in-vitro-experiments with the cultured human endothelial cell line ECV-304 and monocytes of the human cell line THP-I.

The endothelial cells were incubated with TNF- α (200 U/mL), oxLDL (30 mg/100 mL) or nLDL (300 mg/100 mL) and the COX-inhibiting substances and were then incubated with monocytes for 30 minutes. After the incubation and a washing the remaining monocytes were quantified by image analysis. The adhesion of monocytes to the stimulated endothelial cells were concentration-dependently inhibited by salicylate derivatives. The effects of 0,5-1 mM concentrations were comparable to those of the antioxidants vitamin C or vitamin E.. Ibuprofen had no influence on the adhesion.

The expression of VCAM-I, measured by use of an ELISA, was reduced by salicylate derivatives, whereas ibuprofen had no effect.

The release of 8-iso-PGF $_{2\alpha}$, from endothelial cells stimulated with nLDL was decreased by the salicylates ASA and NCX-4016 concentration-dependently, whereas the release of the oxidative way generated isoprostane at incubation with ibuprofen was not influenced.

The redox-sensitive activation of NF- κ B by LDL was inhibited by all salicylates at 1 mM concentration. The inhibition was comparable with the effects of 0,1 mM PDTC, a well known NF- κ B-inhibitor. The NF- κ B-activation was not influenced by ibuprofen.

The results of this study suggest that salicylates unlike ibuprofen inhibit monocyte adhesion to the stimulated endothelium due to antioxidative effects of these substances.

Die vorliegende Arbeit entstand von Juli 1998 bis September 2001 in Zusammenarbeit des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. med. Hasso Scholz), des Instituts für Pharmazie der Universität Hamburg (Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Detlef Geffken) mit dem Institut für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen C. Frölich), bei denen ich mich für die gebotenen Arbeitsbedingungen und ihre Betreuung bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Rainer H. Böger, der diese Arbeit mit seiner kritischen, kreativen und hilfsbereiten Art umfassend und kontinuierlich betreute, sowie Prof. Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Duchstein für seine Unterstützung bei der Fortsetzung der Arbeiten in Hamburg.

Bei Dr. rer. nat. Dimitrios Tsikas, Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm und Herrn Frank-M. Gutzki möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und die Durchführung der GC-MS- und GC-tandem-MS-Analysen bedanken. Desweiteren möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie für die gute Zusammenarbeit danken. Mein Dank gilt insbesondere Frau Maria T. Suchy und Frau Bibiana Schubert für die Hilfestellung bei der Labortätigkeit.

Für die Hilfe bei der Etablierung des „ELISA“ für die ECV-304-Zellkultur danke ich Frau Martina Flehsig von der Abteilung Nephrologie des Zentrums Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover.

Für die Bereitstellung von 2-Acetoxybenzoat-2-[2-nitrooxy-methyl]-phenylester (NCX-4016) danke ich der Firma Nicox, Sophia-Antipolis, Frankreich.

Für die Durchführung des „Gel-Shift-Assays“ für NF- κ B danke ich Dr. med. Bernhard Schieffer vom Institut für Molekulare Kardiologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Promotion in jeglicher Form unterstützt haben.

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

ABS	Absorption
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
ADP	Adenosindiphosphat
L-Arg	L-Arginin
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ANOVA	analysis of variance
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
ConA	Concanavalin A
CONC	Konzentration
COX	Cyclooxygenase
cpm	Zerfälle pro Minute
kDa	Kilodalton
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DFO	Deferoxamin
DNS, DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECV	Endothelzelllinie
EDCF	endothelialer kontraktierender Faktor
EDHF	endothelialer hyperpolarisierender Faktor
EDRF	endothelialer relaxierender Faktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM-1	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule 1 (CD62e E-Selectin)
ELISA	Enzym-linked immunosorbent Assay
ET	Endothelin
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FBS, FKS	Fetales Kälberserum
FMN	Flavinadeninmononukleotid

g	Erdbeschleunigung
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-MS/MS	Gaschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
GMP-140	granular membrane protein-140
GTN	Glycerintrinitrat
HBSS	Hanks' balanced salts solution
HDL	high density lipoprotein
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[4-butansulfonsäure]
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
IBU	Ibuprofen
ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül
I κ B- α	inhibitorische Untereinheit von NF- κ B
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IRE	iron responsive elements
IRE-BP	iron responsive elements-binding protein
IRP	iron regulatory protein
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbidmononitrat
Kat	Katalase
KHK	koronare Herzerkrankung
LDL	low density lipoprotein
nLDL	natives low density lipoprotein
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
LFA	Lymphozyten-Funktions-assoziiertes Antigen
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
M	Mol
MCP-1	monozytäres chemotaktisches Peptid-1
MEM	minimum essential medium
MIA	Mikropartikelenzymimmunoassay
mL	Milliliter
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF- κ B	nukleärer Transkriptionsfaktor B

NIK	NF- κ B induzierende Kinase
NO [•]	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
kPa	Kilopascal
PBS	Phosphatpuffer
PDGF	platelet derived growth factor
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
PECA	platelet endothelial cell adhesion
PFB-Bromid	Pentafluorobenzylbromid
PG	Prostaglandin
PH	potentia hydrogenii, Maß für die Wasserstoffionen-Konzentration
PLSD	protected least significant difference
PMA	Phorbolmyristataacetat
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNS, RNA	Ribonukleinsäure
mRNS, mRNA	messenger- Ribonukleinsäure
SDMA	symmetrisches Dimethylarginin, N ^G , N ^G -Dimethyl-L-Arginin
SEM	standard error of the mean
sog.	sogenanntes
SOD	Superoxiddismutase
SPE	solid phase extraction
SRM	selected-reaction monitoring
SS	Salicylsäure
THP	Monozytenzelllinie
TNF	Tumornekrosefaktor
TXA	Thromboxan A
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
vs.	Versus
X	Xanthin
XOD	Xanthinoxidase
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Vom Endothel freigesetzte Substanzen mit Wirkung auf die Gefäßeigenschaften	2
1.1.1	Vom Endothel gebildete relaxierende Faktoren.....	2
1.1.1.1	Vom Endothel gebildeter Relaxationsfaktor (EDRF, Stickstoffmonoxid)	2
1.1.1.2	Weitere, vom Endothel freigesetzte relaxierende Faktoren	8
1.1.2	Vom Endothel gebildete vasokonstriktive Faktoren	9
1.2	Immunologische Reaktionen des Endothels	12
1.2.1	Reaktionen unter physiologischen Bedingungen	12
1.2.2.	Reaktionen unter pathophysiologischen Bedingungen	13
1.2.2.1	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	13
1.2.2.2	Zelladhäsionsmoleküle.....	15
1.3	Eingriffe in den Pathomechanismus der Atherosklerose	16
1.4	Beeinflussung der Monozyten-Endothelzell-Wechselwirkungen durch Salicylate...	20
2	Zielsetzung	22
3	Methoden	24
3.1	Zellbeschreibung	24
3.1.1.1	Endothelzelllinie.....	24
3.1.1.2	Kultivierung der Endothelzelllinie	24
3.1.2.1	Monozytenzelllinie.....	25
3.1.2.2	Kultivierung der Monozytenzelllinie	25
3.2	Durchführung der Monozytenadhäsionsversuche.....	26
3.3	LDL-Isolierung	27
3.3.1	Bestimmung des Cholesteringehalts der LDL-Fraktion	28
3.3.2	Bestimmung der Triglyceride im gewonnenen LDL	29
3.3.3	Bestimmung des Proteingehaltes nach Lowry	30
3.4	Gewinnung von oxidiertem LDL (oxLDL).....	30
3.5	Bestimmung von Zellzahl und Lebensfähigkeit der Zellen	32
3.6	Bestimmung von Nitrit in Zellüberständen.....	33
3.7	Bestimmung von 8-iso-Prostaglandin F _{2α} als Indikator für oxidativen Stress	34
3.8	„Enzyme-linked immunosorbent Assay“ (ELISA) für VCAM-I.....	36

3.9	„Gel-Shift-Assay“ für NF- κ B	38
3.9.1	Stimulation der Zellen.....	38
3.9.2	Herstellung der Kernextrakte	38
3.10	Ferritinbestimmung	39
3.11	Radioimmunoassay zur Bestimmung des 6-Ketoprostaglandins F _{1α}	40
3.12	Statistische Analyse	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Adhäsionsversuche.....	43
4.1.1	Adhäsionsversuche mit Salicylaten und Ibuprofen.....	45
4.1.2	Adhäsionsversuche mit Referenzsubstanzen	49
4.2	Nitritfreisetzungsversuche.....	57
4.3	„Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) für das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1)	58
4.4	Bestimmung des 8-iso-Prostaglandin F _{2α} als einen Indikator für oxidativen Streß...	60
4.5	Bestimmung von 6-Ketoprostaglandin F _{1α}	62
4.6	Ferritin-Assay.....	64
4.7	“NF- κ B-Gel-Shift-Assay”	65
5	Diskussion	68
5.1	Effekte von nativem und oxidiertem „Low Density Lipoprotein“-Cholesterin und Triglyceriden auf die Monozytenadhäsion und den oxidativen Stress	69
5.2	Bedeutung des LDL bei oxidativen Prozessen.....	70
5.3	Einfluß von Antioxidantien auf die Adhäsion von Monozyten am stimulierten Endothel	70
5.4	Effekte von Salicylsäurederivaten auf die Monozytenadhäsion und die VCAM-I- Expression	72
5.5	Einfluß von NCX-4016 und Acetylsalicylsäure auf die Bildung des Peroxidationsprodukts 8-iso-PGF _{2α}	74
5.6	Molekulare Mechanismen, die dem antioxidativen Effekt von Acetylsalicylsäure und NCX-4016 zugrunde liegen könnten	74
5.7	Einfluß von Stickstoffmonoxid bei der Adhäsion von Monozyten am stimulierten Endothel	76
5.8	Bedeutung der Ergebnisse für die Pathophysiologie und Therapie atherosklero- tischer Gefäßerkrankungen - Ausblick.....	78

6	Zusammenfassung	79
7	Anhang	81
7.1	Materialien	81
7.1.1	Chemikalien/ Biochemikalien	81
7.1.2	Reagenz-Lösungen	88
7.1.3	Pufferlösungen	88
7.1.4	Geräte	90
7.1.5	Weitere Materialien.....	91
7.2	Literatur.....	91

1 Einführung

Das Endothel spielt eine tragende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion. Es kleidet nicht nur passiv die Innenwand der Gefäße aus, sondern greift auch aktiv in die Regulation des Gefäßtonus und in die Veränderung des Gefäßes ein. Dies geschieht durch Freisetzung von chemischen Botenstoffen und durch Expression von Oberflächenfaktoren.

Bereits vor etwa 20 Jahren entdeckten Furchgott und Zawadzki [1], daß isolierte Arteriensegmente unterschiedlich auf Acetylcholin reagierten - je nachdem, ob das Endothel intakt oder beschädigt ist. Dies war das erste Mal, daß gezeigt wurde, daß das Endothel eigenständig auf Reize reagiert. Seitdem wurde die biologische Relevanz für das Gefäß intensiv erforscht [2, 3, 4]. Mittlerweile ist bekannt, daß das Endothel eine Vielzahl von Mediatoren synthetisiert und freisetzt, wie zum Beispiel die relaxierenden Faktoren Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO[•]), EDHF (endothelial derived hyperpolarising factor) und Prostacyclin (Prostaglandin I₂, PGI₂) und die kontrahierenden Faktoren (EDCF, endothelial derived contracting factor) und Endothelin (ET-1).

Insbesondere von dem gut erforschten Stickstoffmonoxid hat man herausgefunden, daß es nicht nur relaxierende Effekte auf das Gefäß, sondern auch anti-atherogene Wirkungen hat [5].

Das Endothel produziert zudem immunologische Faktoren, wie die Zytokine Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8, MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) und PDGF (Platelet-derived growth factor) [6] und Moleküle, die die Adhäsion von Zellen an der Zelloberfläche koordinieren, wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, CD 106), ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, CD 54) und ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1, CD 62E) [7]. Endothelzellen vermögen so Zellen wie Monozyten nach Stimulation „anzulocken“. Diese können ihrerseits das atherosklerotische Geschehen vorantreiben durch Phagozytose von low density lipoprotein (LDL) und Degeneration zu Schaumzellen sowie durch Freisetzung von Superoxidradikalen.

1.1 Vom Endothel freigesetzte Substanzen mit Wirkung auf die Gefäßeigenschaften

1.1.1 Vom Endothel gebildete relaxierende Faktoren

1.1.1.1 Vom Endothel gebildeter Relaxationsfaktor (EDRF, Stickstoffmonoxid)

Der „Endothelium-derived Relaxing Factor“ [1, 8], der später als das Radikal Stickstoffmonoxid identifiziert wurde [9-12], wird aus dem terminalen Guanidinrest des L-Arginins [13, 14] durch die endotheliale NO[•]-Synthase gebildet (eNOS, NOS III, EC 1.14.13.39) [15, 16]. Das L-Arginin wird sowohl in der Endothelzelle synthetisiert [17] als auch mit Hilfe des Na⁺-unabhängigen γ⁺-Transporters für kationische Aminosäuren beziehungsweise des Na⁺-abhängigen B^{0,+}-Transporters von der Endothelzelle aufgenommen [18, 19]. Die Reaktion erfolgt über ein intermediär gebildetes N-Hydroxy-L-arginin [20] in Gegenwart von Nicotinamidadenindinukleotid (NADPH), 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Flavinadeninmono- und dinukleotid (FMN, FAD) [21]. Aus einem Mol L-Arginin wird dabei 1 Mol L-Citrullin und 1 Mol Stickstoffmonoxid gebildet [Abb. 1].

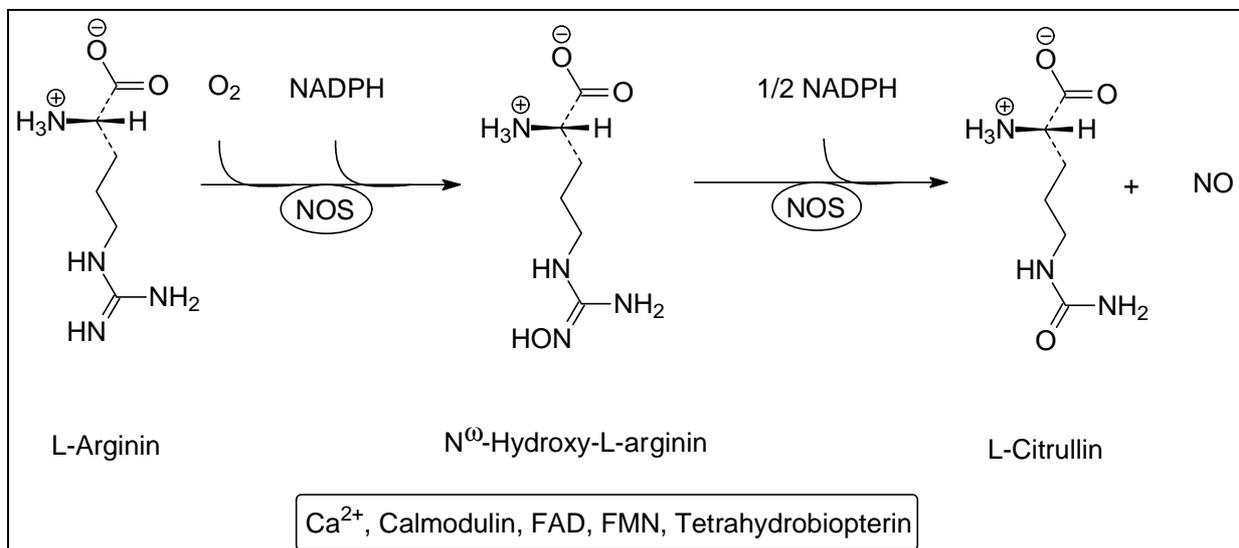


Abb. 1 Biosynthese von Stickstoffmonoxid (NO[•]) aus L-Arginin

Ein natürliches Analogon des L-Arginins ist das an einem Stickstoff der Guanidin-Gruppe zweifach methylierte N^G,N^G-Dimethyl-L-arginin (asymmetrisches Dimethylarginin, ADMA). Neben diesem konnten aus kultivierten Endothelzellen [22] und isolierten

Blutgefäßen [23] auch N^G , N^G -Dimethyl-L-arginin (symmetrisches Dimethylarginin, SDMA) und N^G -Monomethyl-L-arginin (NMMA) isoliert werden [Abb. 2].

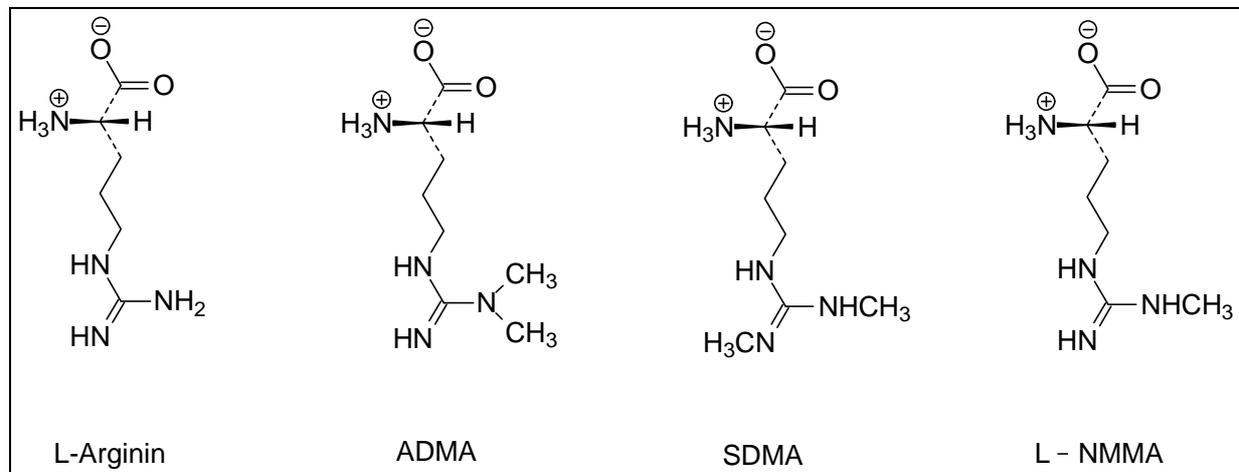


Abb.2 *L-Arginin und methylierte L-Arginin-Analoga*

Ghosh et al. [24] stellten fest, daß die Methylierung hauptsächlich am proteingebundenen Arginin stattfindet. Die Methylierung wird durch das Enzym Protein-Arginin-N-Methyltransferase katalysiert, welches in zwei Isoformen vorkommt [24, 25]. Asymmetrische Methylierungen finden vor allem durch die Protein-Arginin-N-Methyltransferase I, symmetrische Methylierungen hauptsächlich durch den Typ II statt [24].

Das asymmetrische Dimethylarginin und das Monomethylarginin können die NO^{\bullet} -Synthase kompetitiv inhibieren [26]. Dies ist pathophysiologisch insofern interessant, weil vermutet wird, daß erhöhte ADMA-Werte, wie sie bei pAVK-Patienten [27] und hypercholesterinämischen Patienten [28] gefunden wurden, über diesen Mechanismus zu einer verminderten Synthese an Stickstoffmonoxid und damit zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes führen. In Gegenwart von nativem und oxidiertem LDL konnten erhöhte ADMA-Konzentrationen beobachtet werden [29, 30]. Goonasekera et al. [31] beobachteten eine Relation zwischen der Erhöhung von vaskulären Zelladhäsionsmolekülen-1 (VCAM-1) und ADMA und Miyazaki et al. [32] fanden eine positive Beziehung zwischen erhöhtem ADMA-Level und den Risikofaktoren der Atherosklerose.

Von der NO^{\bullet} -Synthase sind drei Isoformen bekannt. In der Endothelzelle kommt jedoch nur die NOS-III vor. Sie wird wie die Isoform I konstitutiv gebildet, während die NOS-II nur nach Stimulation exprimiert wird.

Eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der endothelialen NOS spielt eine gesteigerte zytoplasmatische Calciumionen-Konzentration

Auf höherer Ebene wird die Genexpression der NOS-III-mRNS durch Cytokine gesteuert. Förstermann [33] stellte dies bei der Herabregulation der NOS-III-Expression durch TNF- α fest.

Das Radikal NO \cdot diffundiert als sehr lipophiles Agens schnell aus der Endothelzelle. Stickstoffmonoxid ist ein relativ kurzlebiges Radikal (Halbwertszeit unter experimentellen Bedingungen ca. 3-5 Sekunden [34, 35]), das leicht mit anderen ungepaarten Elektronen reagiert. Gegebenenfalls reagiert Stickstoffmonoxid mit Mercaptogruppen aus den Mercaptoamino-säuren Cystein, Acetylcystein bzw. dem Glutathion unter Bildung von S-Nitrosothiolen in Reaktion. S-Nitroso-substanzen konnten in vivo nachgewiesen werden [35, 36]. Diese S-Nitroso-Verbindungen haben teilweise eine wesentlich längere Halbwertszeit (1 Minute bis 280 Stunden nach Mathews und Kerr [35]) als das Stickstoffmonoxidradikal und können als „stabile Stickstoffmonoxide“ aufgefaßt werden. Ramsay et al. [37] zeigten, daß S-Nitroso-Verbindungen ähnlich wie Stickstoffmonoxid vasorelaxierende und thrombozytenaggregationshemmende Wirkungen aufweisen.

NO \cdot bewirkt außerhalb der Endothelzelle eine Relaxation der glatten Muskelzellen [8, 10], eine Hemmung der Proliferation der glatten Muskelzellen [38, 39], eine Hemmung der Oxidation von LDL [40] sowie eine Hemmung der Monozyten- [41, 42] und Thrombozytenadhäsion [43].

Die Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen und die Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation ist Guanylatzyklase-cGMP-vermittelt [43, 44]. Die Aktivierung der Guanylatcyclase erfolgt, wie Craven [45] zeigte, über die Reaktion des NO \cdot mit dem Häm-Zentrum der Guanylatcyclase. Das Stickstoffmonoxid reagiert mit dem Häm-Eisen unter Bildung von Nitrosyl-Häm-Komplexen, die dann an der Reaktion mit der löslichen Guanylatzyklase beteiligt sind.

Auf der Transkriptionsebene beeinflusst NO \cdot die Regulation einer Vielzahl von Genen wie die vom MCP-1, P-Selectin und dem VCAM-1 durch direkte oder indirekte Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren [46-48].

Stickstoffmonoxid stimuliert die Aktivität sowohl der konstitutiven (COX-1) als auch der induzierbaren (COX-2) Cyclooxygenase [49] und führt damit zu einer gesteigerten Prostaglandinsynthese [50]. Diese Stimulation erfolgt unabhängig von cGMP und läßt den Schluß zu, daß unter Bedingungen, in denen sowohl NOS als auch COX vorliegen, ein NO \cdot -vermittelter Anstieg in der Bildung proinflammatorischer Prostaglandine auftritt [51].

Stickstoffmonoxid reagiert mit dem Superoxidradikal unter Bildung von intermediärem Peroxynitrit. Dieses hat bei neutralem pH-Wert eine Halbwertszeit von weniger als einer

Sekunde [52] und reagiert unter Isomerisation weiter zu Nitrat [53] oder zerfällt nach Bildung eines Adduktes aus ONOO^- und ONOOH zu Nitrit und Sauerstoff [54]. Bei dem Zerfall von Peroxynitrit entstehen möglicherweise unter anderem auch Hydroxyl-Radikale [55], die als starke Aktivatoren der Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 bekannt sind [56]. Jedoch zeigen andere Studien, daß die Reaktionen von Peroxynitrit (auch in saurem Milieu) nicht durch Radikalfänger beeinflusst wurden, so daß die Beobachtungen als OH^\bullet -Radikal-ähnlich interpretiert werden können, ohne daß OH^\bullet -Radikale auftreten [57].

Peroxyalpetrige Säure ist ein starkes Oxidans, welches mit den funktionellen Gruppen zahlreicher Proteinkomplexe reagiert. Peroxynitrit wird durch Übergangsmetalle heterolytisch gespalten in ein Hydroxylanion und ein Nitroniumion. Das Nitroniumion greift Phenole an unter Bildung von Nitrophenolen. Ein stabiles, quantitativ entstehendes Produkt aus der Reaktion von Tyrosin mit Peroxynitrit ist das 3-Nitrotyrosin [58], das als ein Indikator für den oxidativen Stress angesehen wird [59] und mit Hilfe einer spezifischen GC-MS/MS-Methode auch quantitativ analysiert werden kann [60].

Landino et al. und Goodwin et al [61, 62] beobachteten, daß Peroxynitrit die Cyclooxygenaseaktivität steigert und stellten somit fest, daß es wohl eine physiologische Funktion für die Bildung von Peroxynitrit gibt: die Verknüpfung von Stickstoffmonoxid mit der gesteigerten Bildung von Prostaglandinen.

Ob die Reaktion des Stickstoffmonoxidradikals mit dem Superoxidradikal eher protektive oder proinflammatorische Eigenschaften in sich birgt, ist zur Zeit noch Gegenstand einer kontroversen Diskussion, denn einerseits wird zytotoxisches Superoxid abgefangen, andererseits wird toxisches Peroxynitrit gebildet.

Das Radikal NO^\bullet ist ebenso in der Lage, Superoxid-Verbindungen einzugehen mit Folgeprodukten aus den Reaktionen mit. So werden Lipid-peroxy- zu Nitrosoperoxy-Verbindungen und Lipid-oxy- zu Nitrosoxy-Verbindungen derivatisiert unter Unterbrechung der radikalischen Kettenreaktion [Abb. 3]. Diese Umsetzungen erscheinen relevant bei der Reaktion von NO^\bullet mit partiell oxidiertem LDL-Lipoprotein [40].

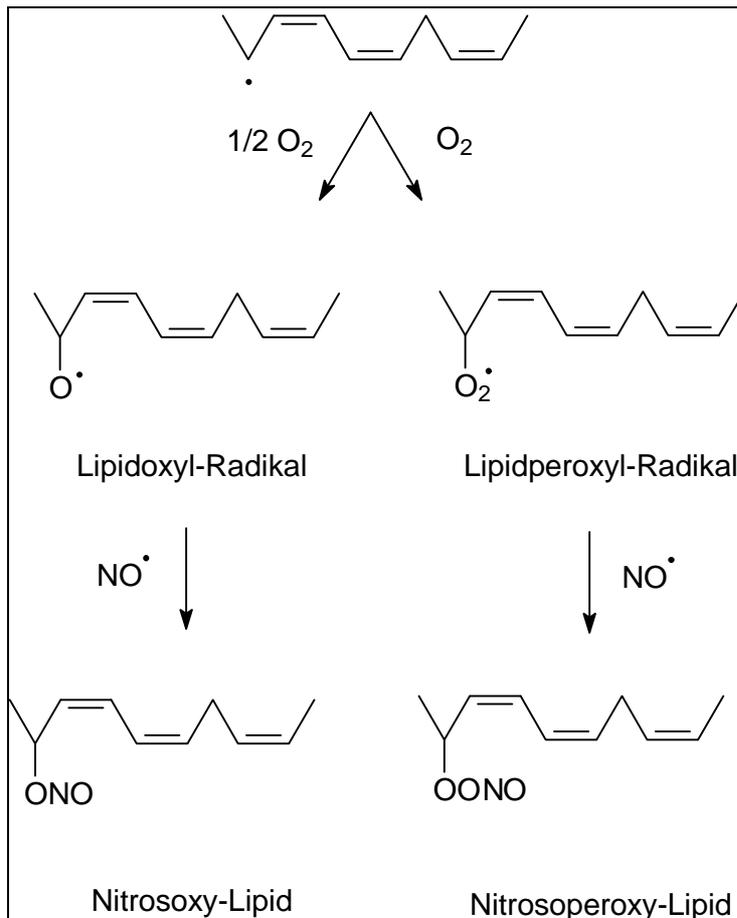


Abb. 3 Lipidperoxidation und Reaktionen der oxidierten Lipidverbindungen mit Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid beeinflusst die transkriptionelle und posttranskriptionelle Ferritinsynthese [63]. Die Meinung, ob Stickstoffmonoxid die Ferritinsynthese heraufsetzt oder reduziert, ist strittig.

Richardson et al. [64] postulierten, daß Stickstoffmonoxid durch Reaktion mit dem IRE-BP (iron responsive elements-binding protein), einem eisenabhängigen Regulatorprotein, reagiert. Dieses Protein bindet an das IRE der Ferritin-mRNS und unterdrückt die Translation. Theoretisch gäbe es zwei Angriffspunkte: Stickstoffmonoxid nitrosyliert die Mercaptogruppe des Cysteins 437 des IRE-BP oder NO^\bullet reagiert direkt mit den 4Fe-4S-Clustern unter Bildung des Apoproteins, welches an IRE bindet. Dies hätte eine Reduktion der Ferritinsynthese zur Folge.

Yee et al. [65] zeigten dagegen einen von Häm-Eisen-unabhängigen Anstieg der Ferritinsynthese nach Gabe des NO^\bullet -Donators SNAP.

Oberle et al. beobachteten ähnliches bei Linsidomin [66] und bei PETN [67].

Anscheinend verursacht Stickstoffmonoxid eine Freisetzung von Eisen aus Proteinbindungen, so daß intrazelluläres, freies Eisen ansteigt und dadurch das IRP-2 (iron regulating protein-2) von der Ferritin-mRNS abdissoziiert und die Translation von Ferritin ermöglicht.

Ferritin bindet freie Eisenionen, die an oxidativen Reaktionen als Katalysator ähnlich wie bei der Fenton-Reaktion beteiligt sind.

Ursachen für eine verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid und Einfluß von exogenem L-Arginin

Als Grund für verminderte Stickstoffmonoxid-Verfügbarkeit kann ein Mangel an Edukt, eine Hemmung des katalysierenden Enzyms oder ein schnelles Abfangen des Produkts genannt werden.

Ursächlich für einen Mangel an Edukt kann die Hemmung des Transporters sein, der L-Arginin in die Endothelzelle befördert. Von Closs et al. [68] wurde gezeigt, daß sich der γ^+ -Transporter in vitro durch hohe L-SDMA- und α -Amino- δ -isothioureidovaleriansäure (AITV)-Konzentrationen hemmen und damit die L-Arginin-Konzentration in der Endothelzelle vermindern läßt.

Eine Hemmung der NO^{\bullet} -Synthase ist durch L-Arginin-Analoga möglich. Zu diesen gehören Substanzen, die an der terminalen Guanidinstruktur ein- bzw. zweifach methyliert sind (ADMA bzw. L-NMMA) [69]. ADMA wird durch die Dimethylaminohydrolase (DDAH) enzymatisch in L-Citrullin und Dimethylamin gespalten.

Durch die Hemmung des Enzyms DDAH mit der Substanz S-2-Amino-4(3-methylguanidino)-butansäure ließ sich eine negative Rückkopplung auf den L-Arginin-Stickstoffmonoxid-Schritt zeigen [70].

Oxidiertes LDL (oxLDL) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) führen über eine Destabilisierung der für die endotheliale NO^{\bullet} -Synthase kodierenden mRNS zu einer verminderten Expression der NOS-III [71, 72].

Auch ein Abfangen des Produkts Stickstoffmonoxid durch Reaktion mit dem Superoxid unter Bildung von Peroxynitrit ist für eine verringerte NO^{\bullet} -Bioverfügbarkeit denkbar.

Eine gesteigerte Superoxidradikalbildung wurde bei hypercholesterinämischen Kaninchen während einer diätetischen Supplementierung mit L-Arginin beschrieben [73, 74, 75]. Mügge et al. [76] konnten demonstrieren, daß eine Gabe von Superoxid-Dismutase zu einer Besserung der endothelabhängigen Vasodilatation bei Cholesterin-gefütterten Kaninchen führte.

Der enzymkatalysierten Gleichgewichtsreaktion folgend wäre eine Steigerung der NO[•]-Produktion durch Zufuhr des Edukts L-Arginin denkbar. Böger et al. [77] zeigten in tierexperimentellen Studien, daß es bei hypercholesterinämischen Kaninchen durch L-Arginin-Gabe zu einer verminderten Progression der Atherosklerose kam. Sowohl Girerd et al. [78] als auch Cooke et al. [79] fanden eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation bei Arginin-Gabe. Eine Verbesserung der NO[•]-Verfügbarkeit durch Arginin-Gabe wurde auch in anderen Bereichen der Pathogenese der Atherosklerose entdeckt. So wurde durch L-Arginin-Zufuhr die Thrombozyten-Aggregation, die Thromboxan-A₂-Synthese, die Leukozyten-Aktivierung bei Hypercholesterinämie vermindert [80, 81] und die Adhäsion von Monozyten am Endothel reduziert [82]. Dies wurde wahrscheinlich durch eine Verringerung der Expression von Adhäsionsfaktoren wie z. B. MCP-1 [82] und eine verminderte vaskuläre Superoxid-Freisetzung [83] hervorgerufen.

Metabolismus von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid wird vor allem zu Nitrit beziehungsweise Nitrat oxidativ metabolisiert [84], die dann aufgrund ihrer chemischen Stabilität quantitativ analysiert werden können [85, 86].

1.1.1.2 Weitere, vom Endothel freigesetzte relaxierende Faktoren

Ein anderer wichtiger Vasodilatator ist das Prostacyclin (PGI₂). Prostacyclin ist das Hauptprodukt der vaskulären Cyclooxygenase [87]. PGI₂ verursacht eine dosisabhängige Relaxation [88] durch Aktivierung der Adenylatcyclase, hemmt die Thrombozytenaggregation [89] und die Leukozytenmigration in vitro [90].

Das Endothel bildet ferner eine bis dato noch nicht näher charakterisierte Gruppe von Substanzen, die als „vom Endothel gebildeter hyperpolarisierender Faktor“ (EDHF) zusammengefaßt werden. Dieser ist dafür verantwortlich, daß selbst dann eine endothelvermittelte Relaxation auftritt, wenn sowohl Cyclooxygenase-Hemmer als auch NO[•]-Synthase-Hemmer bzw. Inaktivatoren des Stickstoffmonoxids (z.B. Hämoglobin oder Methylenblau) anwesend sind [91]. Daher wird die Existenz eines anderen Faktors

angenommen, der unabhängig von Stickstoffmonoxid und Prostanoiden Endothel-vermittelte Relaxationen auslöst [91-93].

Der vasodilatierende Effekt wird vermutlich über eine Aktivierung von calciumabhängigen Kaliumkanälen (K_{Ca}) an der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt [94-96]

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die chemische Natur des EDHF noch nicht geklärt. Hinweise deuten darauf hin, daß es sich entweder um Cytochrom P450-abhängige Metaboliten der Arachidonsäure, den Epoxyeicosatriensäuren (EET) [97], um Arachidonylethanolamid, ein abgeleitetes Cannabinoid [98] oder um Kaliumionen [99] handelt.

1.1.2 Vom Endothel gebildete vasokonstriktive Faktoren

Vom Endothel werden ebenfalls Stoffe gebildet, die am Gefäß vasokonstriktiv wirken [100]. Zu diesen gehören das Prostaglandin-Endoperoxid H_2 , Thromboxan A_2 , Endothelin-1 [101] und das Superoxidradikal $O_2^{\bullet -}$. Gupte et al. [102] zeigten, daß die Applikation von $O_2^{\bullet -}$ die Freisetzung des vasokonstriktiven TXA_2 und des $PGF_{2\alpha}$ steigerte und die Freisetzung der vasodilatierenden Prostanoiden PGI_2 und PGE_2 senkte. Ferner fängt das Superoxid-Anion das vasodilatierende Stickstoffmonoxid unter der Bildung von Peroxynitrit ab.

Das PGH_2 ist das 15-Hydroxyderivat des PGG_2 . PGG_2 wird durch die Cyclooxygenase aus Arachidonsäure gebildet und anschließend durch eine Peroxidasreaktion zur Hydroxyverbindung reduziert. PGH_2 wird dann enzymatisch oder nicht-enzymatisch zu PGE_2 , PGD_2 und $PGF_{2\alpha}$ metabolisiert.

Thromboxan A_2 wird durch enzymatische Konversion aus PGH_2 gebildet. TXA_2 hat eine Halbwertszeit von 30 Sekunden in wässriger Lösung bei $37^\circ C$ und wird in das biologisch inaktive, aber stabilere TXB_2 hydrolysiert, welches als Indikator für gebildetes TXA_2 quantifiziert werden kann.

Das Endothelin wurde zuerst von Yanagisawa et al. [103] beschrieben. Bei dem Endothelin handelt es sich um drei einander ähnliche Peptide ET-1, ET-2, ET-3. Das Endothelin-1 ist die vorherrschende Isoform im menschlichen Gefäßsystem. Die vasokonstriktorische Wirksamkeit des Endothelin-1 ist etwa zehnmal größer als die von Angiotensin II.

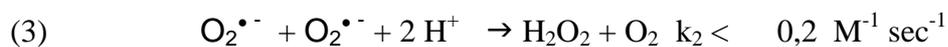
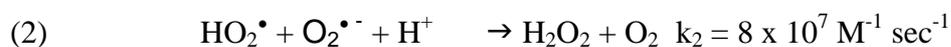
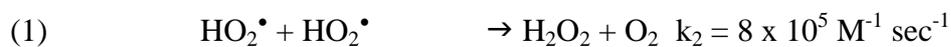
Superoxidradikale werden von verschiedenen Oxidoreduktasen, insbesondere der NADH/NADPH-Oxidase [104-106], der endothelialen NO[•]-Synthase [107, 108], der Cytochromperoxidase [109], sowie der Aldehydoxidase, der Dihydroorotdehydrogenase, Flavindehydrogenase, Xanthinoxidase [106, 110, 111], Peroxidasen und während der Autooxidation von Verbindungen wie der Katecholamine [112] oder Übergangsmetall-Ionen gebildet.

Die Bildung von Superoxid durch die NOS wurde das erste Mal von Pou et al. [113] beschrieben.

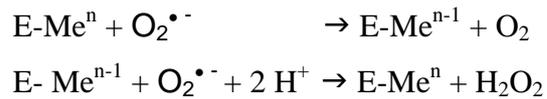
Pritchard und Mitarbeiter fanden 1995 heraus, daß die NOS III bei Hypercholesterinämie selbst eine Quelle für Superoxid darstellen kann [114]. Vázquez-Vivar [115] definierte näher, welche Kofaktoren die O₂^{•-}-Bildung der eNOS (endotheliale NOS, NOS III) beeinflussen. Sie stellten fest, daß die Bildung von Superoxid durch Dissoziation des Eisen-Sauerstoff-Komplexes der NOS begünstigt wird [115]. Die Anwesenheit von Tetrahydrobiopterin und L-Arginin stabilisiert den Komplex und es wird vermehrt NO[•] und Citrullin gebildet. Dieses Ergebnis wurde von Stroes et al. [108] bestätigt.

Das Gleichgewicht zwischen NO[•] und Superoxid wird also nicht nur zwischen zwei verschiedenen Enzymsystemen bestimmt, sondern zusätzlich auch durch die Anwesenheit von Kofaktoren reguliert.

Das Superoxidanion-radikal wird durch Einelektronentransfer auf Sauerstoff gebildet. Es ist der Ausgangspunkt der Sauerstofftoxizität in der Zelle. O₂^{•-} dismutiert bei physiologischem pH-Wert rasch gemäß der Reaktionen 1, 2 oder 3 zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff [116, 117].

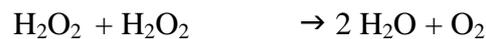


Die Reaktion 3 wird durch die Superoxiddismutase katalysiert. Der Katalysator sorgt dabei dafür, daß der Elektronentransfer zwischen zwei Superoxiden stattfindet, ohne daß die beiden Moleküle direkt zusammentreffen müssen. Der Mechanismus der Katalyse wurde von Fridovich [118] formuliert.



E stellt dabei die Proteinstruktur des Enzyms dar, Me das Metall - im Falle der Kupfer-Zink-Superoxiddismutase das Kupfer.

Das immer noch cytotoxische und atherogene [119] Wasserstoffperoxid wird durch die bekannte Reaktion mit Hilfe der Katalase zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt [118].

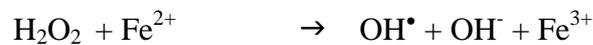


Wasserstoffperoxid wird außerdem zu einem nennenswerten Anteil durch Peroxidasen gemäß der Reaktion:

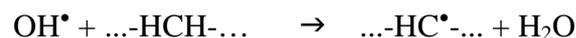


zu Wasser reduziert.

Wasserstoffperoxid wird aber auch ähnlich der Fenton-Reaktion



zu dem Hydroxylradikal OH^\bullet umgesetzt, welches ein starkes Oxidans darstellt. Wahrscheinlich findet diese Reaktion in vivo jedoch nicht mit Eisenionen statt, weil unter physiologischen Bedingungen Schwermetallionen praktisch nicht vorkommen. Eine ähnliche Reaktion ist mit Semichinonen intrazellulär durchaus denkbar. Das Hydroxylradikal ist äußerst reaktiv und kurzlebig. Es reagiert mit fast allen Biomolekülen und kann durch Wasserstoffabstraktion Radikal-Kettenreaktionen starten:



Veränderte Biomoleküle sind dann in der Lage, immunologische Reaktionen voran zu bringen (s.u.). Nennenswert sind dabei noch die Initiierung der Lipidperoxidation und die Bildung von cyclischen Peroxiden, die zu DNS-Strangbrüchen und damit zu Mutationen führen können.

Weitere Reaktionen des Superoxidradikals

Das Superoxidradikal kann in einem sauren Milieu, wie es bei der Inflammation auftritt, zu einem Hydroperoxy-Radikal protoniert werden, welches ebenfalls zu Lipidperoxidationen führt.

Eine weitere Reaktion von wachsendem Interesse ist die Reaktion mit Stickstoffmonoxid unter Bildung von Peroxynitrit. Diese Reaktion ist sowohl unter diagnostischen als auch unter pathophysiologischen Gesichtspunkten von Interesse.

Einerseits stellt die Reaktion der beiden Radikale ein Abfangen von Superoxidanion-Radikal dar, andererseits geht protektives und relaxierendes Stickstoffmonoxid verloren. Unter physiologischen Bedingungen kann das von Mitochondrien und von membranständigen Oxidasesystemen erzeugte Superoxid unter Bildung von wenig Peroxynitrit abgefangen werden. Unter pathophysiologischen Bedingungen wird jedoch wesentlich mehr Superoxid, unter anderem auch von der induzierbaren NOS (neben Stickstoffmonoxid), gebildet, so daß auch wesentlich mehr toxisches Peroxynitrit auftritt und Stickstoffmonoxid fast vollständig abgefangen wird [120].

Peroxynitrit nitrosyliert sowohl freie als auch gebundene Aminosäuren. So finden Proteinveränderungen statt. Es wurde gezeigt, daß auch LDL nitrosyliert wird [121]. Peroxynitrit ist ebenfalls in der Lage, Lipidperoxidation in Gang zu bringen [122]

Das Peroxynitrit ist hochreaktiv und reagiert mit der Aminosäure Tyrosin zu Nitrotyrosin, welches gaschromatographisch analysierbar ist [60]. Es wird neben der Bildung von Isoprostanen als Indikator für oxidativen Streß angesehen [123].

1.2 Immunologische Reaktionen des Endothels

1.2.1 Reaktionen unter physiologischen Bedingungen

Unter physiologischen Bedingungen wird LDL über LDL-Rezeptoren (65-80 %) und durch Pinozytose von der Zelle aufgenommen.

Die Zelle deckt ihren Bedarf an Cholesterin durch die Aufnahme von cholesterinreichem LDL. Cholesterin wird von der peripheren Zelle vor allem zur Membranstabilisierung benötigt.

Die membranständigen Oxidasen, die mitochondrialen Oxidasen sowie die Enzyme der Atmungskette und die NOS III produzieren geringe Mengen an Superoxid. Dies wird relativ rasch durch die Superoxiddismutase und die Katalase zu Wasser umgesetzt oder reagiert in geringen Mengen mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit.

1.2.2. Reaktionen unter pathophysiologischen Bedingungen

Bei Vorherrschen einer Hypercholesterinämie wird in unphysiologischem Maße LDL von der Endothelzelle pinozytiert. In weiteren Schritten folgt ein Ungleichgewicht zwischen Stickstoffmonoxid und Superoxidradikalen. LDL wird oxidiert und partiell chemisch verändert, worunter die Zytotoxizität stark zunimmt. Es kommt zur endothelialen Dysfunktion und zu erhöhtem intrazellulären oxidativen Stresses.

1.2.2.1 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Die Endothelzelle reagiert auf Stimulation mit Noxen chemischer (z.B. TNF- α , Phorbol ester, aktive Sauerstoffspezies, durch Sauerstoffradikale veränderte Lipidperoxide) [124], physikalischer (Strahlung) [125] oder biologischer Art (Lipopolysaccharide, hohe LDL-Konzentrationen) [126, 127] prinzipiell gleich. Über Nozizeptoren erfolgt eine Weiterleitung des Signals über mehrere Proteine. Eine wohl zentrale Rolle nimmt die Proteinkinase NIK (NF-kappaB-inducing kinase) ein. Diese phosphoryliert einen Multiproteinkomplex, zu dem die Proteine IKK- α (IkappaB kinase alpha) und IKK- β (IkappaB kinase beta) gehören [128]. Durch diese wird wiederum die I κ B- α am Serin 32 und 36 phosphoryliert und markiert für eine anschließende Umsetzung mit Ubiquitin. Die Ubiquitinylierung bewirkt eine Proteolyse des I κ B, welches zu den Untereinheiten p50, p65 und dem Protein I κ B- α durch ein Proteosom getrennt wird. Die DNS-bindenden Untereinheiten, die am häufigsten aus den Proteinen p50 und p65 bestehen, wandern in den Zellkern und aktivieren ihre Zielgene. Ferner kommen auch die Untereinheiten c-Rel, RelB und p52 vor.

Die Aktivierung von NF- κ B durch reaktive Sauerstoffspezies ist zwar bewiesen [129, 130], es ist aber noch nicht klar, an welcher Stelle der Signalübertragungskaskaden diese angreifen [131; 132].

Das NF- κ B wurde von Sen und Baltimore [133] in Kernextrakten aus B-Zellen entdeckt. Sie fanden heraus, daß dieser Transkriptionsfaktor konstitutiv an ein „cis-Element“ der κ -Ketten von Immunglobulin bindet. Das NF- κ B besteht aus zwei DNS-bindenden Untereinheiten, die durch nicht-kovalente Assoziation mit dem inhibitorischen Protein I κ B im Zytoplasma der Zelle zurückgehalten werden. Erst nach Proteolyse wird es in die aktive, nukleäre Form umgewandelt und kann die Zellkernmembran passieren.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert viele Gene, die für immunologisch wichtige Substanzen kodieren. Hierzu gehören neben den Zytokinen und Immunorezeptoren auch die Zelladhäsionsmoleküle. Das p50/p65-Heterodimer bindet unter anderem auch an die κ B-Bindungsstelle von den Genen, welche E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 kodieren.

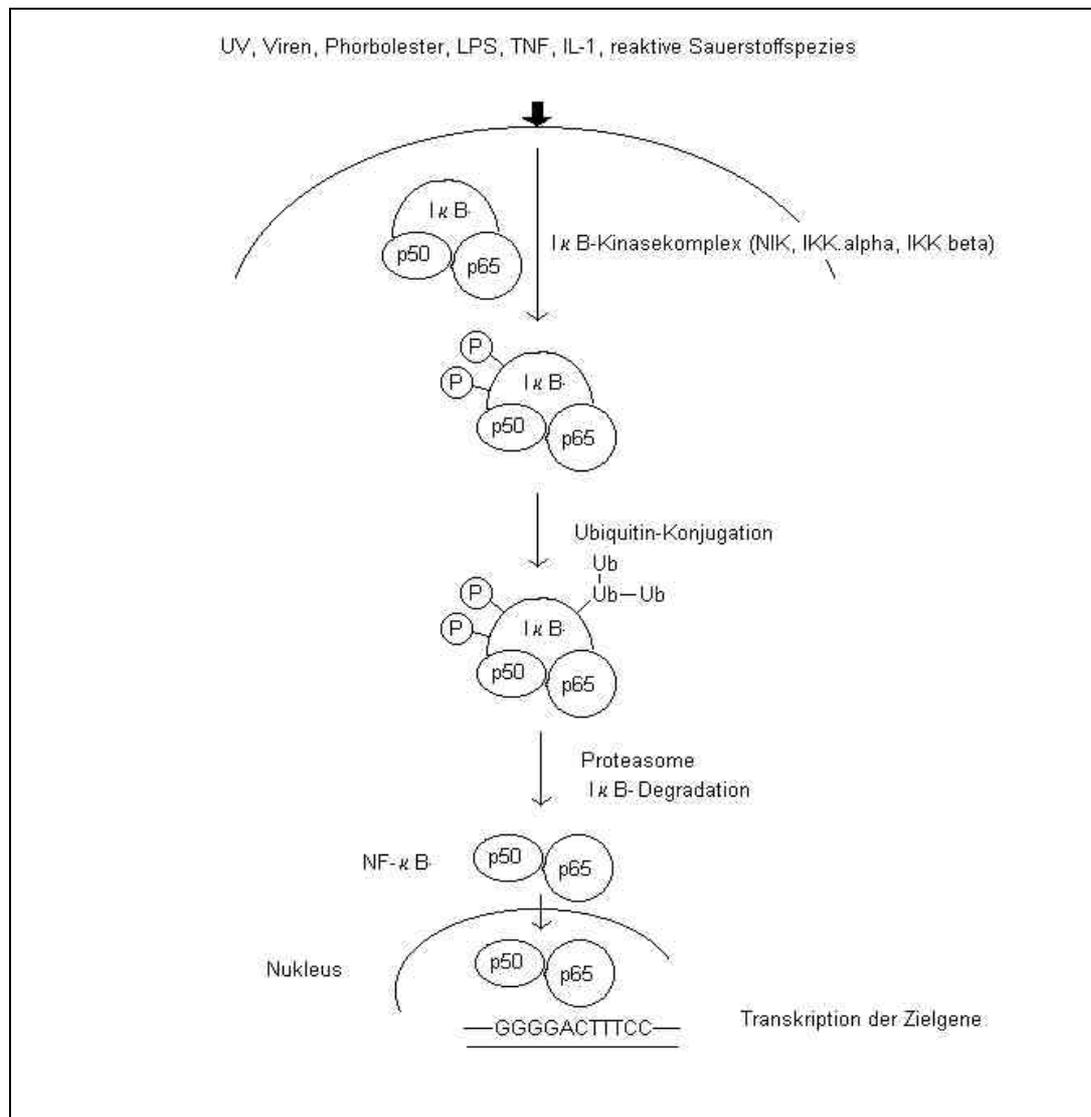


Abb. 4 NF- κ B-Signaltransduktionsweg (nach [134])

1.2.2.2 Zelladhäsionsmoleküle

1.2.2.2.1 Das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül VCAM-1

Das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Es hat eine Masse von 90-110 kDa. Es wurde zum ersten Mal von Osborn et al. [135] beschrieben. VCAM-1 bindet zirkulierende Monozyten und Lymphozyten, die ihrerseits die Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ (CD 49 d/29, VLA-4) exprimieren [136]. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, daß sich VCAM-1 in atherosklerotischen Läsionen wiederfinden läßt [137-141].

VCAM-1 (CD 106) wird von den Endothelzellen nur nach Stimulation exprimiert und kommt im unstimulierten Endothel praktisch nicht vor [7]. VCAM-1 kann man also als einen Indikator für Cytokininduktion ansehen.

Nach Stimulation von Endothelzellen ist die Zahl der exprimierten vaskulären Adhäsionsmoleküle 2-3 Stunden nach Stimulation am höchsten und senkt sich im Laufe der folgenden Stunden wieder ab.

Die Transkription vom VCAM-1-Gen erfordert zwei Tandembindungsseiten für NF- κ B [142]. In Mutationsversuchen wurde von dieser Arbeitsgruppe gezeigt, daß die Bindungsstellen für NF- κ B sich in der basalen Promotorregion an den Positionen -73 und -58 befinden und daß beide für die cytokinabhängige Transkription nötig sind.

1.2.2.2.2 Weitere Adhäsionsmoleküle, deren Expression von NF- κ B abhängig ist

Die Untereinheiten des NF- κ B binden ebenfalls an κ B-Bereiche der E-Selektin- und ICAM-1-Promotoren.

E-Selektin ist ein Mitglied der Selectin-Familie, zu der auch noch das P-Selektin und das L-Selektin gehören. Selectine sind Oberflächenmoleküle, die schwache und reversible Wechselwirkung mit ihren Rezeptoren eingehen. Auf diese Weise wird die Zellbewegung der zirkulierenden Zellen reduziert und sie werden für stärkere Bindung zugänglich.

Das E-Selektin (ELAM-1) wird innerhalb von 3 bis 6 Stunden nach der Reizung des Endothels durch de-novo-Synthese exprimiert. Als Mediatoren kommen wie beim VCAM-1 bakterielle Lipopolysaccharide, Interleukin-1 und der TNF- α in Frage.

Das ICAM-1 gehört wie das VCAM-1 zu der Immunglobulin-Superfamilie. Die Bindungen zwischen den Integrinen der Leukozyten und den endothelialen Adhäsionsmolekülen sind irreversibel. ICAM-1 (CD 54) bindet an das monozytäre Integrin LFA-1. Die Transkription von ICAM-1 wird durch die gleichen Agentien bewirkt, welche auch die Transkription von ELAM-1 und VCAM-1 stimulieren.

Die anhaftenden Monozyten bewegen sich zu einer interzellulären Kontaktstelle des Endothels und wandern durch diese und die interzelluläre Matrix durch. Dies erfolgt durch eine homophile Bindung zwischen PECA-Molekülen (platelet endothelial cell adhesion molecule), die sowohl von Endothelzellen als auch von Monozyten exprimiert werden.

Nun können die Monozyten das stimulierende Agens, z.B. Lipopolysaccharide, LDL phagozytieren, verändern und Substanzen freisetzen, die ihrerseits das Entzündungsgeschehen vorantreiben.

1.3 Eingriffe in den Pathomechanismus der Atherosklerose

Die Atherosklerose gehört zu den wichtigsten Funktionsstörungen des Gefäßes und die Folgen der Atherosklerose stellen die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Die Risikofaktoren, die zur Atherosklerose führen, sind vor allem Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes, Adipositas und Rauchen.

Durch hohe LDL-Konzentrationen bzw. durch verändertes LDL findet eine Stimulierung des Endothels statt, welches über Cytokin-vermittelte Aktivierung von Transkriptionsfaktor NF- κ b wie oben dargestellt die Adhäsionsmolekül-Expression vorantreibt. Es bilden sich vermehrt Wechselwirkungen zwischen den Endothelzellen und Monozyten aus, die dann Lipoproteine phagozytieren, zu Schaumzellen degenerieren und das atherosklerotische Geschehen vorantreiben.

Zur Unterbrechung der atherosklerotischen Entwicklung sind aufgrund der oben geschilderten Abläufe mehrere Angriffspunkte denkbar. Im Vordergrund muß ganz klar die Absenkung der Plasmalipoproteine zugunsten einer Erhöhung der Ratio HDL/LDL stehen.

Desweiteren ist eine Unterbrechung der Mediatorokaskade von Interesse. Zur Zeit sind hier als Angriffspunkte die Hemmung der Veränderung des LDL, eine Hemmung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, eine Hemmung der oxidativen Derivatisierung von zellulären

Substanzen und eine Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B von Interesse.

Für die meisten dieser Geschehnisse sind oxidative Modifikationen verantwortlich, die durch den oxidativen Streß in der Zelle, ausgelöst durch die Hypercholesterinämie, entstehen.

Sowohl Ohara et al. [75] als auch Mügge et al. [76] konnten dies zeigen.

Es wurde bereits mehrfach demonstriert, daß oxidativer Streß die Adhäsion von Monozyten steigert und es ist hinlänglich bekannt, daß aktivierte Monozyten Substanzen freisetzen, die den oxidativen Stress noch vorantreiben. So schließt sich der circulus vitiosus.

Eine Unterbrechung dieses Kreislaufs ist durch Antioxidantien bis zu einem gewissen Maß möglich.

Zum Abfangen der entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies kommen

- Enzyme, die reaktive Sauerstoffverbindungen in weniger reaktive oder nicht mehr reaktive Substanzen abbauen
- klassische Antioxidantien, die mit Radikalen unter Bildung von semistabilen Radikalen reagieren und
- Radikale, die selbst Radikale abfangen unter Bildung von nicht-radikalischen Verbindungen

in Frage.

Zu den klassischen Antioxidantien zählen:

Ascorbinsäure, Tocopherolacetat, N-Acetylcystein, Butylhydroxytoluol (Abb. 5)

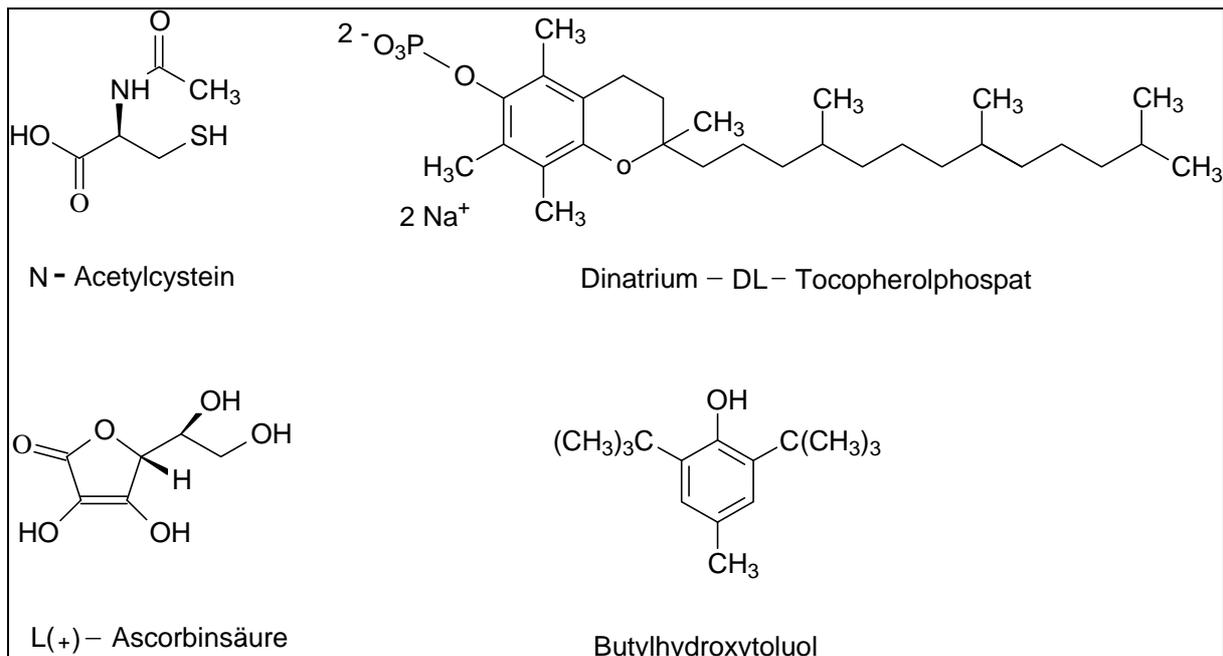


Abb. 5 Strukturformeln von Acetylcystein, Tocopherolphosphat und Vitamin C

Zwei Mol Ascorbinsäure reagieren mit einem Mol Superoxid und einem Proton unter Bildung von Wasserstoffperoxid zu zwei Mol Monodehydroascorbinsäure, welches dann zu einem Mol Ascorbinsäure und einem Mol Dehydroascorbinsäure disproportioniert.

Die antioxidativen Eigenschaften von Tocopherolacetat und Butylhydroxytoluol basieren auf dem Phenolring, der durch das Radikal zu einem Chinon bzw. Chroman oxidiert wird.

Die Aminosäure N-Acetylcystein, die auch Bestandteil des Glutathion/Glutathionperoxidase-systems ist, wird oxidiert zu dem Disulfid Cystin.

Zu den radikalischen Antioxidantien zählen Verbindungen, die mit sehr reaktiven Radikalen, wie dem Superoxidanion-Radikal oder dem Hydroperoxy-Radikal unter Verlust der eigenen Radikaleigenschaften eine Elektronenpaarung eingehen.

Typisch für solche Reaktionen sind Kettenabbruchreaktionen. Diese kommen bei größeren Molekülen aber aus sterischen Gründen nicht sehr häufig vor.

Häufiger ist dagegen die Reaktion mit sehr kleinen Radikalen.

Ein physiologisch wichtiges Radikal stellt das Stickstoffmonoxid dar. Es fängt sehr schnell Superoxidanion-Radikale unter Bildung von geringen Mengen Peroxynitrit ab.



Auch die Aminosäure L-Arginin könnte man in diese Gruppe eingliedern, da L-Arginin eine entscheidende Quelle zur Bildung von Stickstoffmonoxid darstellt.

Der antioxidative Charakter von L-Arginin wurde von Haklar et al. [143] in einem Ischämie/Reperfusionen-Modell gezeigt.

Desweiteren kommen Stoffe als Antioxidans im weiteren Sinne in Frage, die Substanzen abfangen oder hemmen, die oxidative Reaktionen katalysieren.

Als Katalysatoren von oxidativen Reaktionen kommen Metallionen und Oxidoreduktasen in Frage.

Metallionen der ersten Übergangsreihe spielen als Kofaktoren eine wichtige Rolle und sind als Spurenelemente essentiell. Jedoch katalysieren sie auch Redoxreaktionen, die bei dem oxidativen Stress möglicherweise ebenfalls eine Rolle spielen. Besonders Eisen-Ionen und Kupfer-Ionen kommen dabei in Frage. Die Rolle dieser Ionen wird jedoch noch kontrovers beurteilt, weil freie Metallionen intrazellulär praktisch nicht vorkommen.

Metallionen lassen sich durch Komplexbildner abfangen. In der Zelle geschieht dies durch Bindung an Proteine. Chemisch gelingt dies durch Substanzen wie Natriummethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) oder Deferoxamin.

Komplexe mit Ionen sind auch von Phenolen bekannt. Diese Phenol-Eisen-Komplexe sind unter Umständen sogar wesentlich stabiler als die klassischen Chelat-Komplexe von der Art des EDTA-Eisen-Komplexes [144].

Die Hemmung von Enzymen, die Redoxreaktionen katalysieren, stellt eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Superoxidbildung dar. So ist ja schon mehrfach gezeigt worden, daß die Hemmer der Xanthinoxidase Allopurinol und das Oxypurinol die Bildung von Superoxid hemmen [145; 146]

Paler-Martinez et al. [147] zeigten allerdings, daß die Xanthinoxidase bei der Produktion von H_2O_2 über Basalniveau praktisch keine Rolle spielt.

Eine ähnliche Hemmung wäre auch denkbar für weitere Enzyme, die Superoxide produzieren, wie z.B. die NO^\bullet -Synthase II und die Cyclooxygenase.

1.4 Beeinflussung der Monozyten-Endothelzell-Wechselwirkungen durch Salicylate

Bei den Salicylaten handelte es sich um Derivate der 2-Hydroxybenzoesäure, welche in der Natur u. a. in Blüten der Spirae-Arten vorkommt.

Salicylsäure wurde 1859 das erste Mal von A. W. H. Kolbe synthetisch aus Natriumphenol und Kohlendioxid (Kolbesynthese) hergestellt [148]. Von ihm wurde es auch zuerst als Heil- und Konservierungsmittel empfohlen.

1897 wurde von F. Hoffmann erstmals das Acetylderivat der Salicylsäure synthetisiert [149]. Salicylsäure und Acetylsalicylsäure fanden seitdem als Analgetika, Antipyretika sowie bei der Behandlung von Entzündungen Verwendung und werden heute als nicht-steroidale Antirheumatika eingesetzt.

Doch erst 1971 wurde von Vane [150] ein Wirkmechanismus beschrieben. Er konnte zeigen, daß die Wirkung der Acetylsalicylsäure und verwandter Substanzen auf die Hemmung der Prostaglandinbiosynthese beruht. Wenig später erkannte man, daß die selektive Hemmung der membrangebundenen Cyclooxygenase dem Wirkprinzip der Salicylate zugrunde liegt. Durch die Hemmung der Prostaglandinsynthese läßt sich die entzündungshemmende Wirkung jedoch nur zum Teil erklären.

1994 beobachteten Kopp et al. [151], daß Salicylate die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B hemmen, welcher - wie schon - beschrieben eine wichtige Rolle bei der entzündlichen Immunantwort spielt. Diese Beobachtung wurde zwei Jahre später auch von Grilli [152] bestätigt.

Aber erst 1998 konnten Yin und Mitarbeiter [153] zeigen, wie die Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors zustande kommt. Sie stellten fest, daß Salicylate die Phosphorylierung von I κ B hemmen durch Bindung an die IKK- β Untereinheit des I κ B-Kinasekomplexes.

In letzterer Zeit nimmt die Zahl der Beobachtungen zu, daß Salicylate zusätzlich antioxidative Effekte haben [154-157]

Mehrere molekulare Mechanismen zur Erklärung der antioxidativen Wirkung sind bereits untersucht worden.

Hermann und Exner [158, 159] konnten nachweisen, daß Salicylate die LDL-Oxidation durch Peroxynitrit vermindern und daß einer der Metaboliten, die 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Gentisinsäure) ebenfalls antioxidativ wirksam ist und den Salicylateffekt noch verstärkt.

Shi X et al. [160] publizierten eine Untersuchung an einer Monozytenzellkultur bzw. an ungesättigten Fettsäuren, die mit Hydroxylradikal-generierenden Siliziumquarzpartikeln

inkubiert wurden. Das Hydroxylradikal ist ein sehr reaktives Radikal, welches als Intermediat beim oxidativen Stress eine große Rolle spielt. Sie generierten mit Hilfe der Fenton-Reaktion Hydroxylradikale und verwendeten die Elektronen-Spin-Resonanz-Spintrapping-Technik zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit von Wirkstoffen mit den reaktiven Sauerstoffspezies. Sie stellten fest, daß Acetylsalicylsäure mit dem Hydroxylradikal schneller reagiert (Reaktionskonstante $k = 3,6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) als Ascorbinsäure ($k = 1,3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) oder Glutathion ($k = 1,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$).

Denkbar ist auch, daß Salicylate über das Abfangen von Metallionen, die Redoxreaktionen katalysieren, antioxidativ wirken. Abbildung 6 stellt einen solchen Komplex dar. Eisenkomplexe der Salicylsäure bzw. der Gentisinsäure wurden auch als ein antioxidatives Prinzip von Exner [160] postuliert.

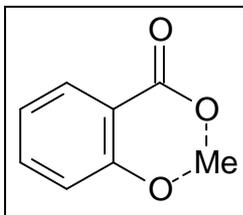


Abb. 6 Komplex eines Metalls mit Salicylsäure

1998 wurde von Oberle et al. [67] ein neuer antioxidativer Weg beschrieben. Sie fanden heraus, daß Acetylsalicylsäure bereits in niedrigen Konzentrationen die Ferritinsynthese induziert, so daß „freie Eisenionen“ als Katalysator einer Reaktion ähnlich der Fenton-Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen.

Die antithrombotischen und die kardioprotektiven Eigenschaften der Acetylsalicylsäure wurden seit der Entdeckung, daß Salicylate die Thrombozytenfunktion beeinflussen [161], zur Infarktprophylaxe klinisch genutzt.

Doch möglicherweise wirken Salicylate auch in einem bestimmten Maße zusätzlich antiatherogen, weil sie den oxidativen Stress verringern.

2 Zielsetzung

Ein wichtiger und entscheidender Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose ist das „Rollen“ von Monozyten an der Endothelzelloberfläche und die Adhäsion der Monozyten an den Endothelzellen. Die Adhäsion von Monozyten wird vermittelt über Adhäsionsmoleküle (VCAM-1 (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1), ICAM-1 (interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1)), die an der Zelloberfläche der Endothelzellen exprimiert werden. Die Expression wird ihrerseits über eine Kaskade von Zytokinen gesteuert. Bei der Aktivierung spielt das Sauerstoffradikal $O_2^{\bullet -}$ und der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine entscheidende Rolle. Ein Abfangen von Sauerstoffradikalen durch Antioxidantien bzw. eine Hemmung des Transkriptionsfaktors vermindert die Expression von VCAM-I und reduziert somit die Zahl adhärerender Monozyten.

Für Salicylate wurde eine hemmende Wirkung auf die Aktivierung von NF- κ B beschrieben.

Ebenso wurden schon antioxidative Effekte von Salicylaten formuliert, die nicht allein mit einer Hemmung der Cyclooxygenase (COX) erklärt werden können.

In der Studie sollten die Effekte der Salicylsäurederivate Salicylsäure (SS), Acetylsalicylsäure (ASS) und NCX-4016 (2-Acetoxybenzoat-2-[2-nitrooxy-methyl]-phenylester) sowie des Arylpropionsäurederivates Ibuprofen (Abb. 7) auf die Adhäsion von Monozyten an stimulierten Endothelzellen, die Bildung von VCAM-I und die Bildung von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ als Indikator für oxidativen Stress untersucht werden.

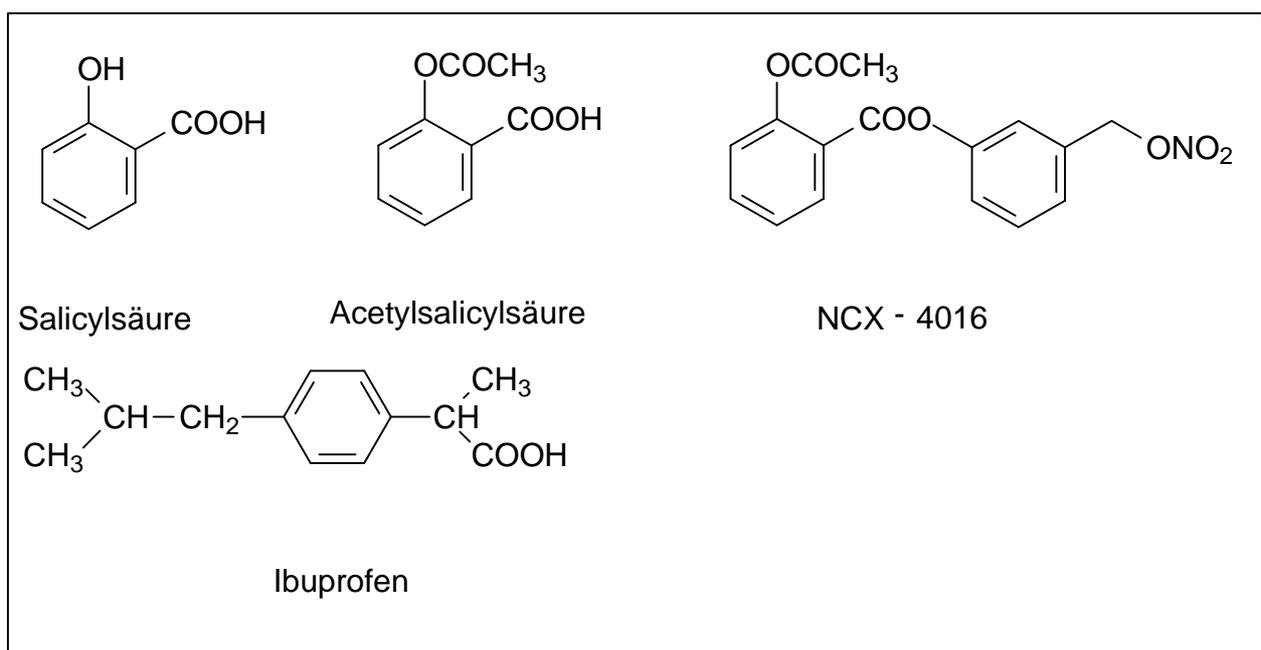


Abb. 7 Strukturformeln der verwendeten Cyclooxygenase-Hemmer

Die Adhäsionsversuche sollten als in-vitro-Versuch mit einer kultivierten humanen Endothelzelllinie (ECV-304) stattfinden.

Dabei sollten die Endothelzellen zunächst mit 200 U/ml TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), 30 mg/dl oxLDL (oxidiertes low density lipoprotein) bzw. 300 mg/dl nLDL (natives low density lipoprotein) stimuliert werden. Im Anschluß wurden zu den stimulierten Endothelzellen Monozyten der humanen Zelllinie THP-1 gegeben und die adhärierenden Monozyten sollten bildanalytisch mit Hilfe eines Mikroskops und einer computerunterstützten Grafikanalysesoftware quantifiziert werden. Von Interesse war, welchen Einfluß eine Koinkubation der Endothelzellen mit den oben aufgeführten Cyclooxygenasehemmern (COX-Hemmer) auf die Stimulation hat.

Anschließend sollte mit Hilfe eines etablierten ELISA für VCAM-1 überprüft werden, wie die Expression des Adhäsionsfaktors durch diese Substanzen beeinflußt wird.

Ferner war von Interesse, ob der Effekt der Hemmung der VCAM-1-Expression auf einer antioxidativen Wirkung der Salicylsäurederivate beruht. Hierfür sollte das 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ aus Zellüberständen nach Inkubation der Endothelzellen mit nLDL und den COX-Hemmern bestimmt werden. Gestigerte Freisetzung von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ist ein Indikator für vermehrtes Vorkommen von reaktiven Sauerstoffspezies. Gleichzeitig sollte auch gezeigt werden, ob die Bildung von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ wirklich COX-unabhängig ist mit Hilfe eines RIA für 6-keto-PGF $_{2\alpha}$, welches COX-abhängig gebildet wird.

Um die Beobachtungen zu untermauern, sollten a) das Verhalten von Referenzsubstanzen genauer untersucht werden, um die Beobachtungen molekularen Strukturen der Substanzen zuordnen zu können, und b) molekularbiologische Effekte dieser Derivate weitergehend erforscht werden.

3 Methoden

3.1 Zellbeschreibung

3.1.1.1 Endothelzelllinie

Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurden Zellen der humanen Endothelzelllinie ECV-304 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um spontan immortalisierte Zellen aus der Nabelschnurvene eines japanischen Neugeborenen (1984, Spendernummer 304). Charakteristisch für die Linie ist adhärentes, pflastersteinartiges Wachstum und ein hohes proliferatives Potential bei gleichzeitiger Abwesenheit von Wachstumsfaktoren. Die Zellen wurden negativ getestet auf Faktor VIII-verwandtes Antigen, alkalische und saure Phosphatasen und auf epitheliales Keratin. Die ECV-304-Zellen bewirken die Bildung von Tumoren in BALB /c nu/nu-Mäusen und verursachen Neovaskularisation auf Kaninchen-Kornea. Die Vorlage der Mauslinie wurde zuerst in 1966 als haarlose Maus berichtet, die als spontane Veränderung auftritt. Häufig verwendet wird sie in der Krebsforschung. Diese Maus eignet sich nur schlecht zur Zucht und wird durch eine heterozygote / homozygote Kreuzung gewonnen. Die heterozygoten Tiere besitzen im Gegensatz zu den homozygoten normale Gesundheit und Fruchtbarkeit und gute Vermehrungseigenschaften. Es wurde berichtet, daß die Zelllinie Pro-Urokinase Typ PA und geringe Mengen an ICAM-1 sowie LFA-3, VCAM-1 und GMP-140 bildet. Die Linie zeigte die für Endothelzellen typischen Reaktionen auf IL-1 und IL-6 [162-164]

3.1.1.2 Kultivierung der Endothelzelllinie

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Deutschland) bei 5,0 % CO₂ und 37°C. Die Zellen wurden in einem der Größe der Kulturflaschen angemessenen Volumen Kulturmedium angesetzt. Das Medium setzte sich zusammen aus Medium 199 (Gibco BRL, No. 31153), 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Das Medium wurde zweimal die Woche gewechselt. Die Endothelzellen wurden bis zur Konfluenz wachsen

gelassen und dann 1:6 aufgeteilt durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung zur Ablösung der Zellen.

3.1.2.1 Monozytenzelllinie

Die für die Adhäsionsversuche verwendeten Monozyten gehörten zur Zelllinie THP-1 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Die Stammzellen dieser Zelllinie wurden einem einjährigen, an akuter myeloischer Leukämie leidenden Jungen entnommen. Die Zellen haben eine runde Morphologie. Sie wachsen einzeln und teilweise in Clustern in Suspension. Die monozytischen Eigenschaften der Zelllinie wurde charakterisiert durch das Vorhandensein von α -Naphthylbutyrat-Esterase, die durch Natriumfluorid inhibiert werden konnte, die Bildung von Lysozym, die Phagozytose von Latexpartikeln und sensibilisierten Schaferythrozyten und die Fähigkeit der T-Lymphozytenaktivierung nach Stimulation mit einem Mitogen (ConA) [165].

Eine Ausdifferenzierung der Zellen konnte durch Zugabe von Phorbolestern induziert werden [166].

3.1.2.2 Kultivierung der Monozytenzelllinie

Die Zellen wurden ebenfalls im Begasungsbrutschrank (5 % CO₂, 37°C) kultiviert. Sie wurden in einer Konzentration von ungefähr $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät und alle 3 bis 4 Tage 1:2 aufgeteilt. Zur Kultur wurde das Medium RPMI 1640 (Gibco BRL) unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet.

3.2 Durchführung der Monozytenadhäsionsversuche

Die Endothelzellen wurden auf 6-Loch-Platten angesetzt, am Folgetag mit kälberserumfreien Medium versetzt und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Am Versuchstag wurden die Zellen gewaschen und mit TNF- α (Endkonzentration: 200 U/ml), nLDL (Endkonzentration: 300 mg/dl) beziehungsweise oxLDL (Endkonzentration 30 mg/dl) und den im Ergebnisteil aufgeführten Arzneistoffen in ansteigenden Konzentrationen in Medium 199 versetzt. Die Endothelzellen wurden auf diese Weise für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit je einem Milliliter Bindungspuffer gewaschen. Die Monozyten der oben aufgeführten Zelllinie wurden in sterile, verschließbare Zentrifugengefäße überführt und für 10 min mit 1200 rpm (ca 500 g) bei 25°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in einem definierten Volumen EDTA-haltigen Hanks Puffer (5 mM EDTA in HBSS ohne Calcium und Magnesium, Gibco BRL) resuspendiert. Ein Aliquot wurde zu Bestimmung der Zellzahl eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit 1200 rpm zentrifugiert und mit Bindungspuffer (2mM CaCl₂ , 2mM MgCl₂ , 10 mM Hepes in HBSS) auf eine Endkonzentration von 6×10^6 Zellen/ml gebracht. Zu den gewaschenen Endothelzellen wurde pro Loch 1 ml Bindungspuffer und 1 ml der Monozytensuspension zugegeben, so daß die Monozytenendkonzentration 3×10^6 Zellen/ml betrug. Die Zellen wurden für 15 Minuten auf einem Kippschüttler bei niedrigster Stufe bei Raumtemperatur koinkubiert. Danach wurden die Schalen um 90° gedreht und es erfolgte eine erneute Inkubation für 15 Minuten. Anschließend wurden die Zellüberstände aspiriert und die Endothelzellen zweimal mit je 2 ml Bindungspuffer gewaschen. Adhärierende Monozyten wurden mit je zwei Milliliter 2-prozentiger Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Die Monozyten wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Olympus) und einer Bildanalysesoftware (Image Analyst) gezählt. Dabei wurden pro Loch 30 Aufnahmen gemacht und der Mittelwert notiert. Es folgte eine sechsfache Bestimmung. Die Abbildungen 8 und 9 stellen solche mikroskopische Aufnahmen dar.

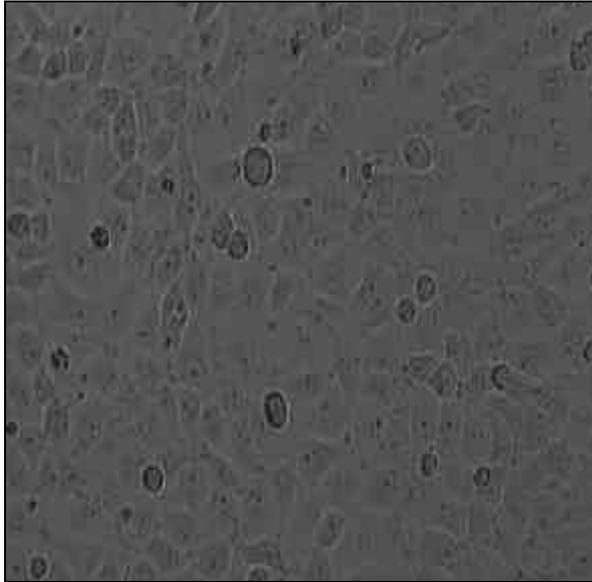


Abb. 8 Mikroskopische Aufnahme während eines Adhäsionsversuches. Im Vordergrund befinden sich vereinzelt Monozyten, im Hintergrund die unstimulierten Endothelzellen

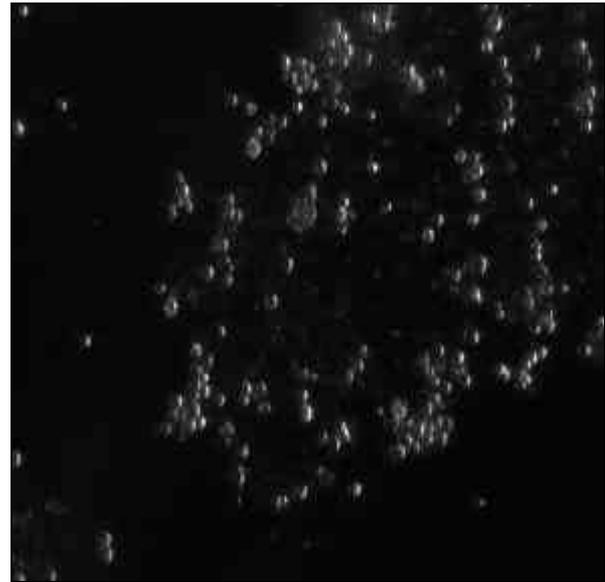


Abb. 9 Mikroskopische Aufnahme eines Adhäsionsversuchs nach Stimulation des Endothels. Durch Kontrastierung leuchten die adhärenen Monozyten auf.

3.3 LDL-Isolierung

Low density lipoprotein wurde aus „fresh-frozen“-Plasma-Konserven der zentralen Blutbank der Medizinischen Hochschule Hannover durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnen. Die Konserven wurden nach Auftauen im Wasserbad bei 37°C in einem skalierten Glasgefäß gepoolt. Dem Volumen an Plasma entsprechend wurden pro 100 mL Plasma sofort 10 µL 200 mM Butylhydroxytoluol (2,2 g Butylhydroxytoluol (BHT) in 50 mL Ethanol), 100 mg Ethylendiammintetraessigsäure (EDTA Titriplex III) und 1,63 g Kaliumbromid zur Einstellung der Dichte auf 1,019 g/mL zugegeben. Nach dem Lösen der Feststoffe im Plasma wurde dieses auf Ultrazentrifugengefäße verteilt und das Plasma für 22 Stunden bei 4°C und 244.700 g ultrazentrifugiert (Beckmann L8-70, Rotor: 50.2TI). Nach der Ultrazentrifugation wurde die sich gebildete gelbe Schicht, die sich direkt unter einer klaren Phase befand, aus allen Ultrazentrifugengefäßen entnommen und in einem Erlenmeyerkolben vereinigt. Pro 1 mL dieser Fraktion, die neben LDL auch noch VLDL und geringe Anteile HDL enthält, wurde 0,0565 g Kaliumbromid zugefügt, um die Dichte auf 1,063 g/mL einzustellen. Es erfolgte eine weitere Ultrazentrifugation für 18 Stunden bei 4°C mit 244.700 g. Die oberste

Phase, die das low density lipoprotein enthält, wurde gesammelt und in eine hydratisierte Dialysekassette (Slide-A-Lyzer, Pierce) überführt. Anschließend wurde die Dialysekassette in ein Becherglas gehängt, das 1,8 g EDTA und 180 μL 200 mM Butylhydroxytoluol in 1,8 L isotoner Natriumchlorid-Lösung enthält. Das LDL wurde auf diese Weise über Nacht im Dunkeln bei 4°C dialysiert. Am folgenden Tag wurde das LDL wieder aus der Dialysekassette entnommen, in sterile, verschließbare Vorratsbehältnisse überführt und bis zur Verwendung lichtgeschützt unter Stickstoffatmosphäre bei 4°C aufbewahrt. Ein Aliquot wurde zur Bestimmung des Cholesterin-Gehalts verwendet.

3.3.1 Bestimmung des Cholesteringehalts der LDL-Fraktion

Die Bestimmung des Gesamtcholesterins der LDL-Fraktion erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen „Kit“ (Cholesterol 20) von Sigma (Deisenhofen, Deutschland).

Die Reagenzlösung besteht aus Cholesterin-Oxidase (mikrobiell) 300 U/L; Cholesterin-Esterase (mikrobiell) >100 U/L; Peroxidase (Merrettich) 1000 U/L; 4-Aminoantipyrin 0,3 mmol/L; 4-Hydroxybenzolsulfonsäure 30,0 mmol/L, gepuffert auf pH 6,5.

Testprinzip

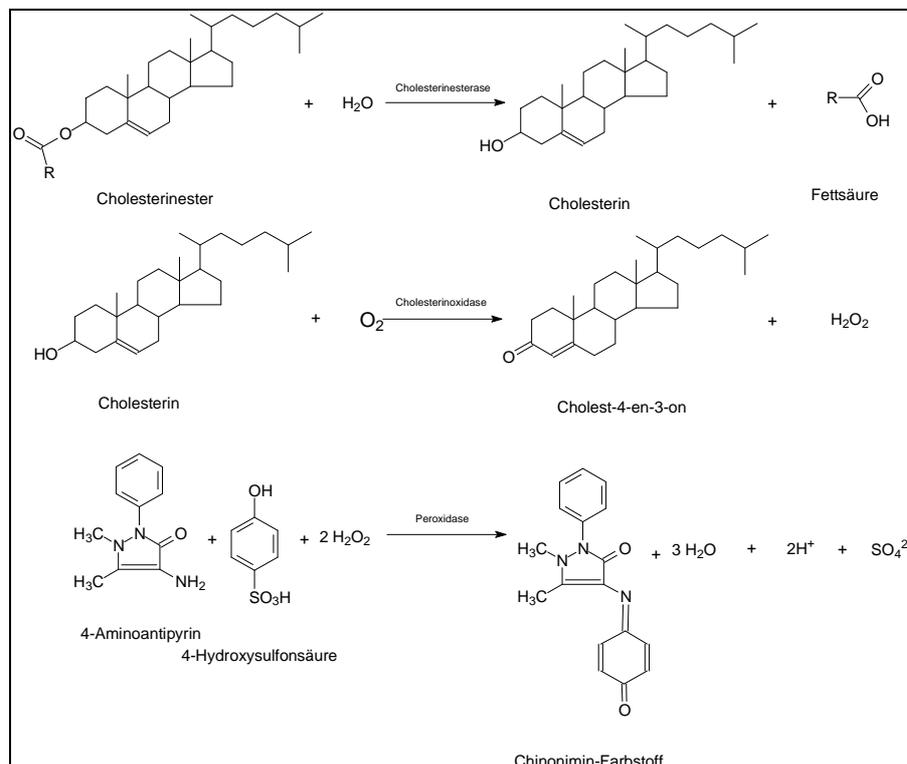


Abb 10 Darstellung der Reaktionen bei der Cholesterinbestimmung

Zur Quantifizierung wurde der Cholesterinkalibrator 200 mg/dL (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Sowohl der „Blank“ als auch der Kalibrator und die LDL-Proben wurden als Doppelwerte gemessen.

Für den Assay wurde das gewonnene LDL 1:20 verdünnt. 10 µL dieser Verdünnung wurde mit 1 mL des Cholesterinreagenz versetzt. Als „Blank“ wurde 10 µL destilliertes Wasser, als Referenz 10 µL des Kalibrators verwendet. Die Proben wurden photometrisch bei 500 nm vermessen.

3.3.2 Bestimmung der Triglyceride im gewonnenen LDL

Stichprobenmäßig wurden die Triglyceride in dem LDL-Stamm bestimmt.

Hierzu wurde das Abbott Vision (Analysegerät zur Bestimmung von Biomarkern in Körperflüssigkeiten auf der Grundlage eine spektroskopischen Messung nach Enzymreaktion Abbott, Wiesbaden), einem Analysegerät zur Bestimmung von Triglyceriden auf der Grundlage eine spektroskopischen Messung nach Enzymreaktion, unter Verwendung eines fertigen „Kits“ (Abbott) und eines Kalibrators (Abbott) benutzt.

Reagenzien

a) Lösungsmittel

Nicotinamid-adenin-dinukleotid,red. (NADH)	0,36	mmol/L
Phosphoenolpyruvat	0,81	mmol/L
Adenosintriphosphat (ATP)	0,062	mmol/L
Magnesiumchlorid	6,2	mmol/L

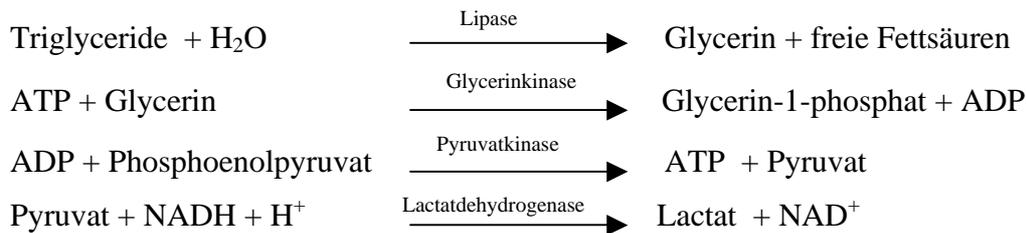
b) Reagenzienkonzentrat

Lipase	1725	U/L
Glycerinkinase	6900	U/L
Pyruvatkinase	13800	U/L
Lactatdehydrogenase	6900	U/L

Der Triglycerid-Test basiert auf einer Methode von Bucolo und David [167]. Die Triglyceridbestimmung erfolgt hierbei über eine enzymatische Hydrolyse der Triglyceride durch eine Lipase und die enzymatische Bestimmung des dabei entstandenen freien Glycerins.

Die Konzentration an Triglyceride korreliert mit der Absorptionszunahme bei 340 nm.

Testprinzip



Im Bereich von 40-440 mg Triglyceride/mL Plasma ist der Test linear mit der Regressionsgeraden: $y = 0,97 x + 0,12 \text{ mg/dL}$; der Korrelationskoeffizient beträgt 0,998

3.3.3 Bestimmung des Proteingehaltes nach Lowry

Das Protein des low density lipoproteins sowie das Protein der Zellrückstände nach Zelllyse wurde nach Verdünnung (1:10) nach Lowry [168] bestimmt. Als Proteinstandardlösung wurde ein Stamm aus 200 µg Rinderalbumin (Bovines Serum Albumin) in bidest. Wasser verwendet (0 – 40 µg/ 200 µL Wasser). Die Proben wurden zuvor so verdünnt, daß das zu bestimmende Protein in dieser Größenordnung lag.

Zu der Standardreihe wurde 1,0 ml Lowry-Reagenz-Mischung (100 Teile 2% Na₂CO₃ in 0,1 N-NaOH, 1 Teil 1 % CuSO₄ in dest. Wasser und 1 Teil 2 % Kaliumnatriumtartrat in dest. Wasser) zugefügt, durchmischt und 0,1 mL Folins Reagenz hinzugegeben. Nach erneutem Durchmischen wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Proben bei 660 nm spektroskopisch vermessen.

In dem Bereich von 0-40 µg Protein war die Standardkurve linear. Regressionsgerade:

$$\text{ABS} = -0,0526 + 0,00972 \cdot \text{CONC} [\mu\text{g}] \quad (\text{Korrelationskoeffizient: } 0,997).$$

3.4 Gewinnung von oxidiertem LDL (oxLDL)

Oxidiertes LDL wurde ähnlich wie das native LDL durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Auf die Zugabe von EDTA und BHT wurde jedoch verzichtet. Jeweils direkt vor dem Versuch wurde der für den Versuch benötigte errechnete Anteil für 8 Stunden bei Licht

und Raumtemperatur mit 5 μM Kupferchlorid oxidiert. Der Erfolg der Oxidation wurde mit der Methode nach Esterbauer [169] bestimmt.

Zur Optimierung der Methode wurde ein Spektrum einer Probenverdünnung aufgenommen.

Das LDL wurde mit PBS auf eine Konzentration von 75 μg LDL-Protein/mL verdünnt.

Zunächst wurde ein Absorptionsspektrum der Probe nach 8 Stunden aufgenommen (Abb. 11).

Die Bildung von Dienen wurde in halbstündigen Intervallen bei 234 nm UV-spektroskopisch unter Verwendung von Quarzküvetten und eines Photometers (LKB Biochrom) vermessen. (Abb. 11, 12)

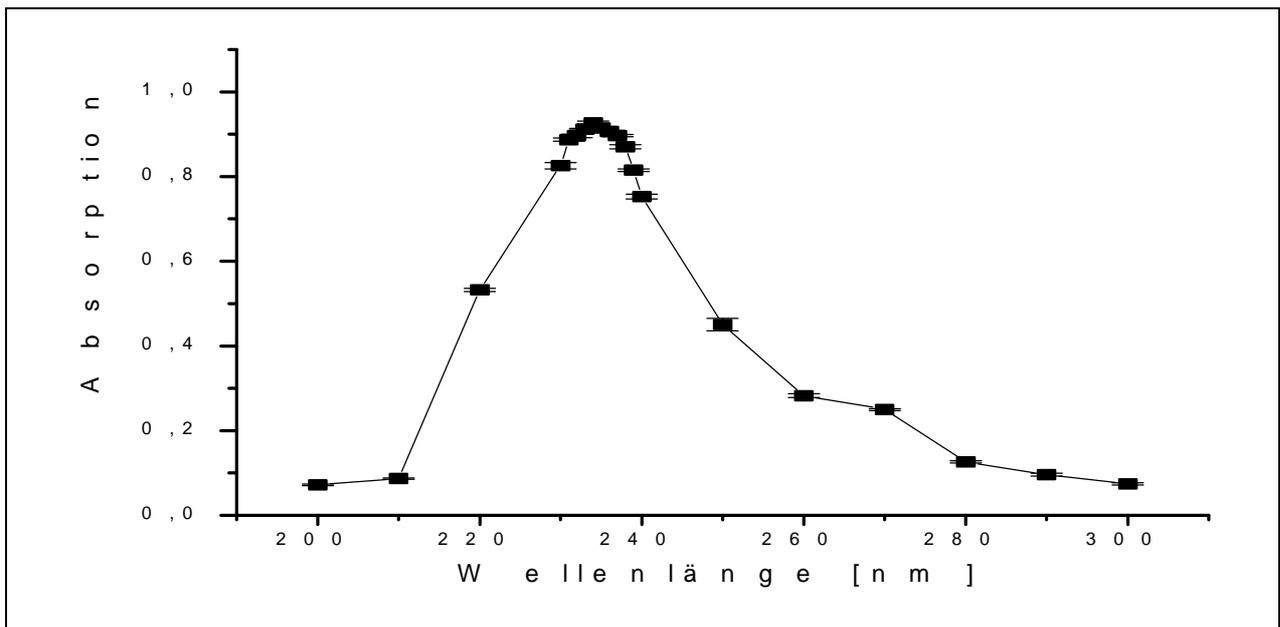


Abb. 11 Absorptionssorptionsspektrum einer verdünnten LDL-Lösung nach Oxidation mit 5 μM Kupferchlorid (75 μg Protein/mL isotonischer Kochsalzlösung). Das Absorptionsmaximum liegt bei 234 nm. Erfasst wurden hier die durch Oxidation des LDL entstandenen Dienstrukturen.

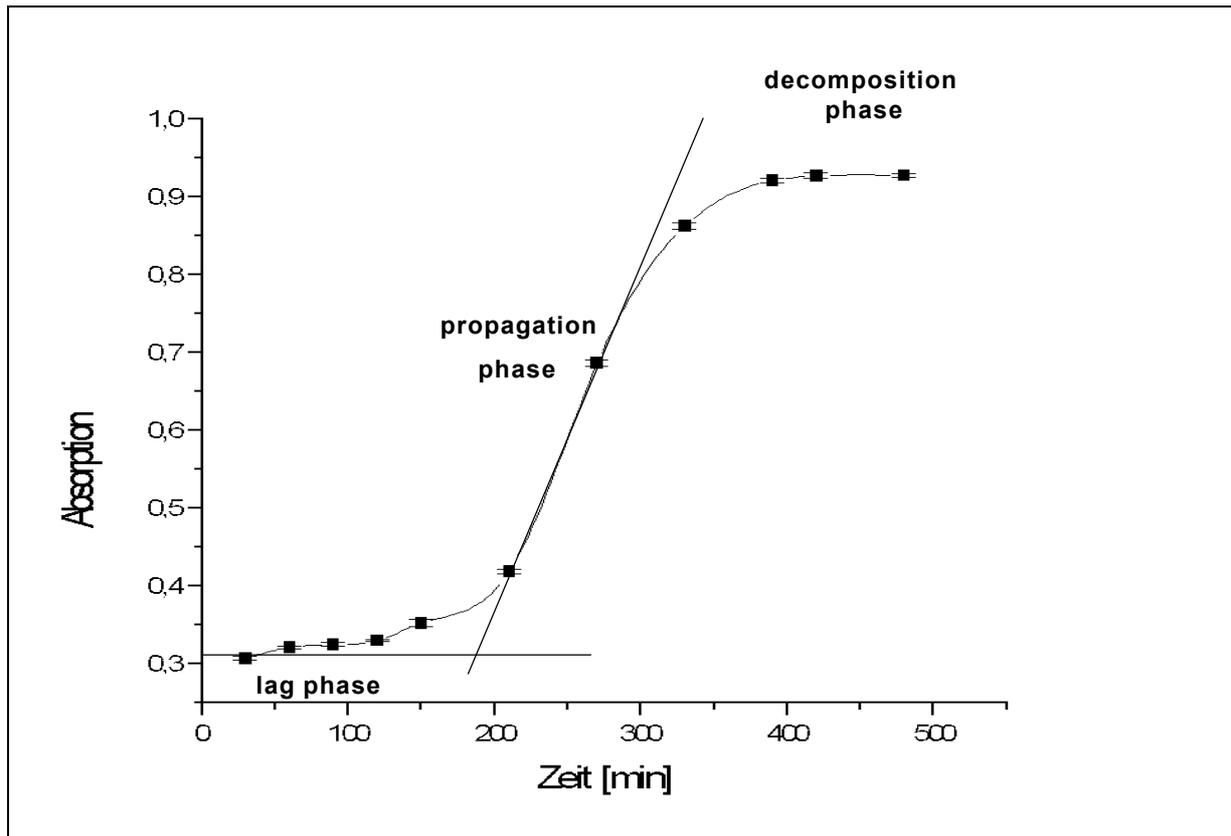


Abb. 12 Darstellung der Abhängigkeit der LDL-Oxidationsprodukte (Dien-Bildung) von der Zeit. Die mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnte LDL-Emulsion ($75 \mu\text{g Protein/mL}$ isoton. Kochsalzlösung) wurde nach Oxidation mit Kupfer kontinuierlich UV-spektroskopisch alle 30 Minuten vermessen.

Nach Etablierung dieser Methode wurde zukünftig nur noch das Ende der Oxidation durch photometrische Messung bestätigt.

3.5 Bestimmung von Zellzahl und Lebensfähigkeit der Zellen

Die Monozytenzahl für die Adhäsionsversuche sowie die Endothelzellzahl bei dem ELISA (s.u.) wurde mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauerkammer) bestimmt. Ausgezählt wurde dafür die Anzahl der Zellen in den acht Eckquadraten. Ein Eckquadrat hat eine Fläche von 1 mm^2 und eine Höhe von $0,1 \text{ mm}$, so daß ein Eckquadrat ein Volumen von $0,1 \mu\text{L}$ aufnehmen kann. Die Zellen wurden zur Untersuchung der Lebensfähigkeit mit $0,4 \%$ Trypanlösung ($0,04 \text{ g Trypanblau}$ gelöst in 10 mL isotoner Kochsalzlösung) verdünnt. Der Test beruht auf der Tatsache, daß tote Zellen gewisse Farbstoffe aufnehmen, während lebende dies nicht machen. Zur Berechnung der Zellzahl wurde der Mittelwert der Zellen der acht Eckquadrate mit dem Faktor 10^4 (dies entspricht dem Verhältnis von 1 mL zu $0,1 \mu\text{L}$) und dem Verdünnungsfaktor sowie dem Volumen der Zellsuspension multipliziert. Die Zellen

wurden nur verwendet, wenn die Zahl der lebenden Zellen mehr als 95 % betrug. Die Lebensfähigkeit der Endothelzellen für die Adhäsionsversuche wurde nach der vierstündigen Inkubationsdauer nur durch mikroskopische Inspektion nach Vitalfärbung durchgeführt.

3.6 Bestimmung von Nitrit in Zellüberständen

Endothelzellen wurden zwei Tage vor dem Versuch in 25 cm² Kulturflaschen angesetzt und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Am Versuchstag wurden die Zellen zweimal mit je 3 mL Wasch-PBS gewaschen und anschließend mit 3 mL einer Lösung aus 10⁻⁴ M Glycerintrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN), NCX-406 bzw. L-Arginin in PBS versetzt. Die Zellen wurden für 2, 4 bzw. 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Parallel wurden die Lösungen im Brutschrank ohne Zellen aufbewahrt und zu den betreffenden Zeiten Proben (n=4) gezogen, um basale Nitritkonzentration zu allen Zeitpunkten erfassen zu können.

Die Zellüberstände wurden nach Abnahme zentrifugiert (1300 U/min, 500 g) und der Überstand bis zur Bestimmung des Nitrits eingefroren.

Der Zellrückstand wurde zweimalig mit je 3 mL PBS gewaschen und dann mit 1 mL Aqua purificata zur späteren Proteinbestimmung (3.3.3) eingefroren.

Bestimmung des Nitrits mit Hilfe der Griess-Reaktion [85]:

Ein 500 µl Aliquot der Probe wurde mit 50 µL Griess-Reagenz A (37,5 mM Sulfanilsäure in destilliertem Wasser) und 50 µL 4N-Salzsäure versetzt. Nach 10 min (20°C) wurde 50 µL Griess-Reagenz B (12,5 mM N-(1-Naphtyl)ethylendiamin-dihydrochlorid in dest. Wasser) hinzugegeben. Erneut wurde für 30 min bei 20°C inkubiert und dann mit 600 µL dest. Wasser verdünnt. Die Absorption wurde bei 540 nm vermessen. Auftragung der Absorption (ABS) gegen die zugesetzte Nitritkonzentration (1-10 µM) (CONC) und lineare Regression ergab die folgende Geradengleichung:

$$\text{ABS} = 0,0395 + 0,03825 * \text{CONC} [\mu\text{M}] \text{ (Korrelationskoeffizient: } 0,998\text{)}.$$

Der Nitritgehalt wurde in Bezug auf das Protein des Zellrückstands bezogen.

3.7 Bestimmung von 8-iso-Prostaglandin F_{2a} als Indikator für oxidativen Stress

Probengewinnung

Die Endothelzellen wurden in 25 cm² -Kulturflaschen angesetzt und bis zur Konfluenz wachsen gelassen.

Die Zellen wurden zweimal mit genau 3 mL sterilem Wasch-PBS gewaschen und anschließend für 6 Stunden mit nLDL 300 mg/dL +/- Inhibitor (s. Ergebnisse) versetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne LDL angesetzt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Nach Ende der Inkubationsdauer wurde der Zellüberstand entnommen und sofort mit dem lipophilen Antioxidans Butylhydroxytoluol (Endkonzentration: 0,002 %) versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -78°C gelagert. Der Zellrückstand wurde erneut zweimal mit je 3 ml Wasch-PBS gewaschen. Darauf folgend wurde zu dem Zellrückstand genau 1 ml kaltes destilliertes Wasser gegeben und der Ansatz bei -20°C eingefroren. Der Rückstand wurde wiederholt aufgetaut und wieder eingefroren, um eine annähernd vollständige Zellzerstörung zu gewährleisten. Das Zellysate wurde in Reagiergefäße überführt und für 5 Minuten bei 4.500 Umdrehungen/ Minute (entsprechend 5.000 g) zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde zur Proteinbestimmung nach Lowry wie unter 3.3.3 aufgeführt verwendet.

Probenaufarbeitung

Festphasenextraktion und Derivatisierung

Der aufgetaute Zellüberstand wurde mit 5000 g (4500 U/min) bei 4°C zentrifugiert. Genau 2,5 ml des Überstandes wurden mit 2,5 ng [3,3', 4,4'-²H₄]-8-iso-PGF_{2α} als internem Standard versetzt. Der pH-Wert der Proben wurde mit 5 molarer Ameisensäure auf einen Wert von 2,0 – 3,0 eingestellt. C₁₈-SPE-Kartuschen (500 mg, Chromabond, Macherey-Nagel, Düren) wurden mit je 10 mL Methanol und 10 mL 0,05 N-Ameisensäure konditioniert. Anschließend wurden die Proben auf die Säulen gegeben. Danach wurden die Kartuschen mit je 10 mL 0,05 N-Ameisensäure und 2 ml Heptan gewaschen. Mit je 2 mL wasserfreiem Ethylacetat wurden die Proben in 4 mL-Polypropylen-Röhrchen eluiert, zunächst bis auf 0,5 mL unter Stickstoff eingengt und nach Überführung in silanisierte „Spitzvials“ unter Stickstoff zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit 100 µl wasserfreiem Acetonitril, 10 µL wasserfreiem Methanol, 10 µL Ethyl-diisopropylamin und 10 µL Pentafluorobenzylbromid (33 %-ig in Acetonitril) angelöst und nach Verschließen mit

Teflonschraubverschlüssen zur Derivatisierung eine Stunde bei 30°C inkubiert. Darauf folgte ein erneutes Einengen des Ansatzes unter Stickstoff zur Trockne. Die Rückstände wurden in 50 µL wasserfreiem Ethylacetat aufgenommen und für mindestens 12 Stunden bei -78°C gelagert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 1.500 g, 4°C), der Überstand in ein weiteres „Vial“ überführt, wiederum unter Stickstoff zur Trockne eingengt und der Rückstand in 20 µL wasserfreiem Ethanol aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie

Die ethanolische Lösung wurde zur Trennung der PFB-Ester für die Dünnschichtchromatographie verwendet. Die Proben und die Referenzsubstanz wurden mit einer Geschwindigkeit von 30 µL/s im Abstand von 20 mm mit einer Breite von 15 mm aufgetragen. Als Referenzsubstanz wurde eine ethanolische Lösung von PGF_{2α}-4-Fluorobenzylester verwendet, die unter den folgenden Dünnschichtbedingungen identische R_f-Werte (R_f = 0,31) wie das 8-iso-PGF_{2α} aufwies. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus 98 Teilen Ethylacetat und 2 Teilen Methanol verwendet. Die DC wurde bei einer Laufhöhe von 16 cm und 5 min Vorkonditionierung unter Kammersättigung durchgeführt.

Die Proben wurden nach Entwicklung in der Höhe der Referenzsubstanz (Detektionsmittel: 6 g CuSO₄ • 5 H₂O in 100 mL einer Lösung aus zwei Teilen Wasser und einem Teil Phosphorsäure 85 %; Erhitzen auf 150 °C für ca. 15 Minuten) in einer 0,6 cm breiten Bande von der Dünnschichtplatte abgetragen und dann mit 500 µL wasserfreiem Ethanol eluiert. Anschließend wurden die Proben 30 min mit 4.000 g zentrifugiert und der ethanolische Überstand in silanisierte „Vials“ überführt und das Lösungsmittel unter Stickstoff entfernt.

Derivatisierung und massenspektrometrische Analyse

Der Rückstand wurde mit 70 µL BSTFA aufgenommen, eine Stunde bei 60°C derivatisiert und dies mittels GC/MS-MS mit einem triple-stage Quadrupol Massenspektrometer TSQ 7000 (ThermoQuest TSQ 7000, Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) verbunden mit einem Gaschromatographen Trace 2000 (Thermoquest) vermessen. Die Probenaufgabe erfolgte mit Hilfe eines Autosamplers (AS 2000, CE Instruments, Austin, TX, USA). Die gaschromatographische Trennung erfolgte über eine 30 m x 0,25 mm ID Kapillarsäule Optima 5-MS (Macherey-Nagel, Düren) mit einer Filmdicke von 0,25 µm. Folgendes

Temperaturprogramm wurde verwendet: 2 min bei 70°C, Aufheizung auf 280°C mit 25°C/min und weitere Erhöhung auf 320°C mit 4°C/ min. Als Trägergas wurde Helium mit einem konstanten Druck von 55 kPa verwendet. Die Temperatur von Interface, Injektor und Ionenquelle wurde konstant gehalten (280°C, 290°C und 180°C). Die Elektronenenergie betrug 200 eV, der Elektronenstrom 600 µA. Zur chemischen Ionisation in der Ionenquelle wurde Methan mit einem Druck von 65 Pa benutzt. Argon wurde als Kollisionsgas im zweiten Quadrupol mit 0,15 Pa Kollisionsdruck und 25 eV Kollisionsenergie verwendet. Zur Detektion der Ionen wurde eine Spannung von 1-2 kV am Sekundär-Elektronen Multiplier angelegt. Die Retentionszeit von 8-iso-PGF_{2α} betrug 20,70 Minuten - die vom internen Standard [3,3', 4,4'-²H₄]-8-iso-PGF_{2α} 20,62 Minuten.

3.8 „Enzyme-linked immunosorbent Assay“ (ELISA) für VCAM-I

Sterile 96-Loch Platten wurden mit je 200 µL pro Loch 1 %-iger, steriler Gelatinelösung für 10 min beschichtet und anschließend kräftig ausgeschlagen. Pro Loch wurden 100 µL einer Zellsuspension hinzugegeben, die 200.000 Zellen pro Milliliter enthielt (Zellzählung erfolgte wie oben aufgeführt). Jedes Loch enthielt also 20.000 Zellen. Eine Stunde nach Ansatz wurde das Medium gegen frisches M-199-Medium (ohne FBS) ausgetauscht und die Zellen für weitere 23 Stunden im Brutschrank belassen. Anschließend wurde zu den Zellen Medium 199 („Blank“), 150 mg/ dL nLDL (Stimulation) beziehungsweise 150 mg/ dL nLDL plus Inhibitor (s. Ergebnisteil) gegeben. Dieser Ansatz wurde für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Löcher ausgeschlagen und einmal mit PBS gewaschen. Hierauf wurde pro Loch 150 µL 1 % frisch hergestellter und sterilfiltrierter Gelatinelösung (1g Gelatine in 100 mL PBS) hinzupipettiert und für 45 min geblockt. Der Überstand wurde ausgeschlagen und danach wurden 100 µL/ Loch 1:50 in PBS verdünnte monoklonale Antikörper gegen VCAM-1 (CD106, 0,2 mg in 1 mL Aqua bidest.) zugegeben und erneut für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde ausgeschlagen und die Zellen zweimal mit je 100 µL PBS pro Loch gewaschen. Zu jedem Loch wurde dann 1:1000 verdünntes biotinyliertes Antimaus-Immunglobulin G pipettiert und wieder für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde wieder ausgeschlagen und die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde pro Loch 100 µL einer Mischung aus 30 µL 3 % Wasserstoffperoxidlösung und 1,1 mg ABTS pro 10 mL Natriumacetat, -

dihydrogenphosphat Puffer (Puffer E, pH2) pipettiert und die Bildung des Chromophors nach 15 und 30 min mit dem Referenzfilter 490 nm und dem Testfilter 405 nm mit Hilfe eines „ELISA-Readers“ gemessen.

Eine erhöhte Absorption korreliert mit einer Erhöhung der Expression von VCAM-1. Anschließend wurden die Zellen noch einmal mikroskopisch inspiziert.

In Vorversuchen wurden die Zellen mit ansteigenden LDL-Konzentrationen stimuliert. Es zeigte sich, daß die Absorption linear zur LDL-Konzentration bis 150 mg/ dL nLDL war (Abb. 13). Jenseits dieser Konzentration wurde eine erhöhte Streuung der Werte und eine Abnahme der Absorption sichtbar. Dies ließ sich damit erklären, daß der stimulierende Effekt von LDL in diesem Konzentrationsbereich sein Maximum erreicht hat. Nachfolgend wurde die optimale Inkubationsdauer bei Stimulation der Zellen mit 150 mg/dl nLDL bestimmt (Abb. 14). Das Optimum lag hier bei 4 Stunden, so daß in den nachfolgenden Versuchen diese Inkubationsdauer gewählt wurde.

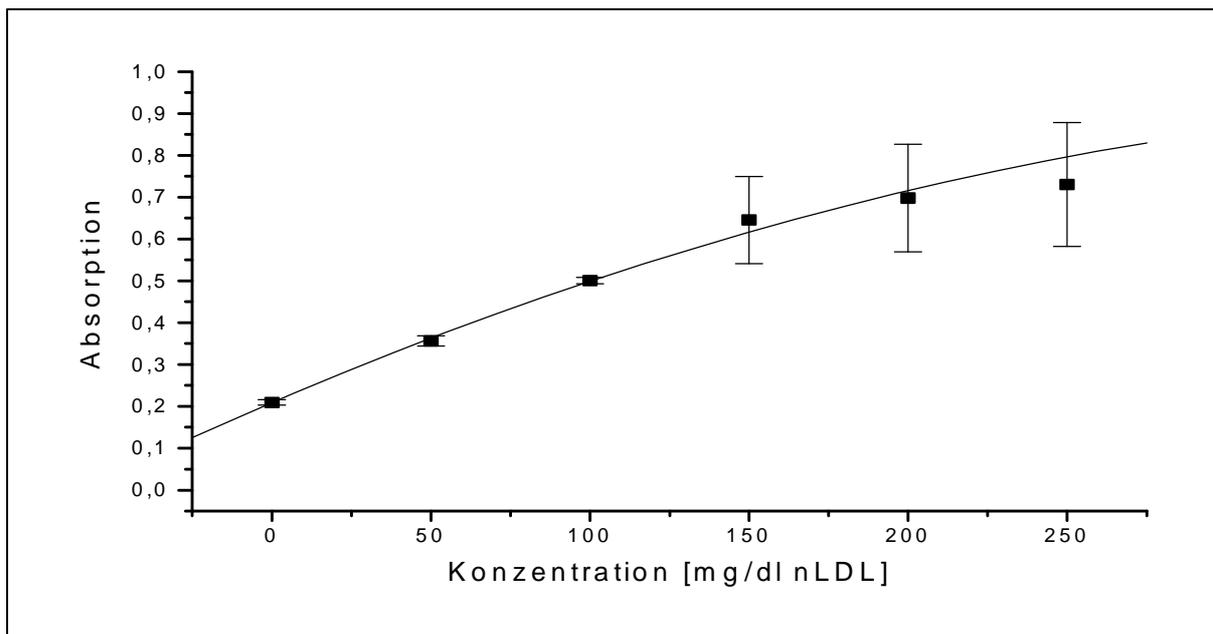


Abb. 13: *Einfluß von ansteigenden nLDL-Konzentrationen auf die Absorption bei einer Inkubationsdauer von 4 Stunden. Dargestellt ist Mittelwert aus jeweils 8 Messungen +/- S.E.M.. Im Bereich bis 150 mg/ dL nLDL ist die Absorption linear abhängig von der LDL-Konzentration .*

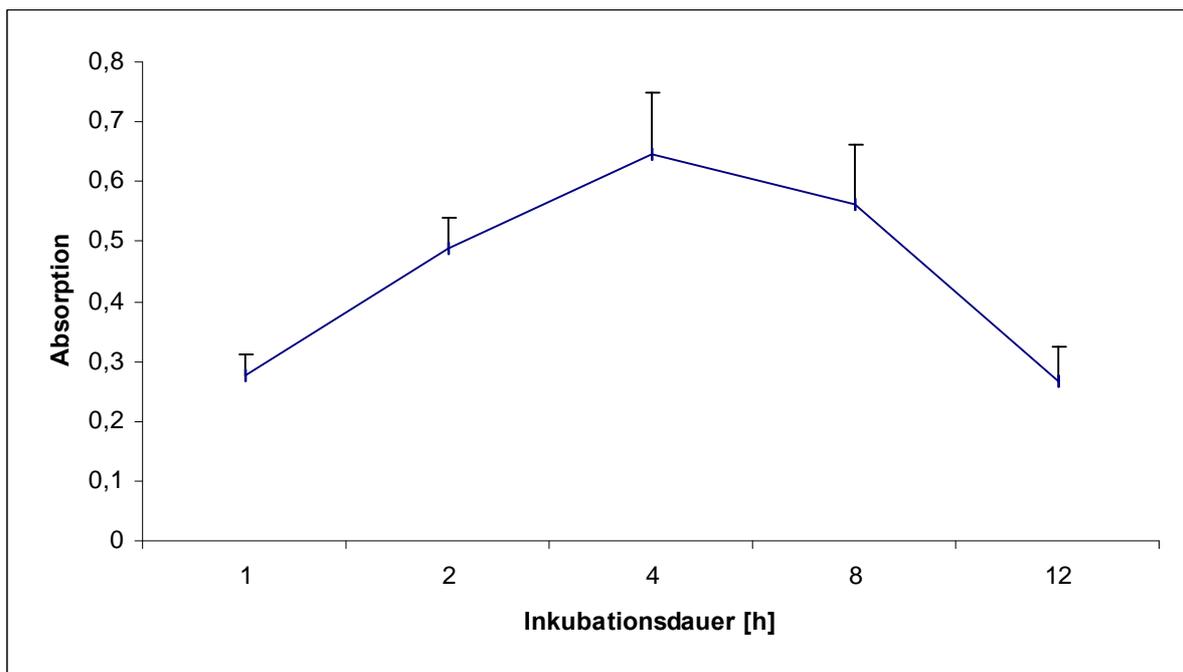


Abb 14: *Einfluß der Absorptionsdauer von der Inkubationsdauer der Zelle mit 150 mg/dL nLDL. Dargestellt wurde der Mittelwert aus 8 Messungen +S.E.M. Das Optimum liegt bei 4 Stunden.*

3.9 „Gel-Shift-Assay“ für NF- κ B

3.9.1 Stimulation der Zellen

Endothelzellen wurden in kleinen Kulturflaschen (25 cm²) angesetzt und bis zur Konfluenz wachsen lassen. Die Zellen wurden für vier Stunden mit 300 mg/dL nLDL und +/- 10⁻⁴ M Arzneistoff im Brutschrank inkubiert.

3.9.2 Herstellung der Kernextrakte

Im Anschluß an die Inkubation wurden die Zellen nach Aspiration des Zellüberstandes mit jeweils 1 mL Trypsin versetzt und abgelöst. Sofort wurde die Trypsinlösung mit 9 mL kaltem PBS versetzt und die Zellen dreimal mit je 10 mL kaltem PBS zentrifugierend (10 min mit je 1200 U/min entsprechend 500 g bei 4°C) gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1,5 mL kaltem PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in Eppendorfgefäße

überführt. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert 13.000 U/min (und der Überstand vorsichtig mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer H resuspendiert und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert.

25 µL Igepal CA-630 (10 %)-Lösung wurden hinzugefügt und der Ansatz durchmischt. 30 Sekunden wurde zentrifugiert (13.000 U/min entsprechend 35.000 g) und der Überstand anschließend mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Zu dem Rückstand wurden 50 µL Puffer I gegeben und resuspendiert. Erneut wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Anschließend wurde für 5 Minuten mit 13.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und die Kernextrakte bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Ein Aliquot der Kernextrakte wurde zur Bestimmung des Kernproteins verwendet, das andere Aliquot wurde zur Bestimmung des NF-κB nach der Methode von Dr. B. Schieffer im Labor für Molekulare Kardiologie der Medizinischen Hochschule Hannover aufgearbeitet und in analysiert.

3.10 Ferritinbestimmung

Endothelzellen wurden in Kulturflaschen angesetzt, wie oben aufgeführt. Nach einer vierstündigen Inkubation mit Kontrollmedium, Aspirin, Salicylsäure, Ibuprofen, NCX-4016 und ISDN wurden die Zellüberstände aspiriert, die Zellen gewaschen und eingefroren.

Der eingefrorene Zellrückstand wurde mit Aqua bidest. aufgenommen. Ein Aliquot wurde zur Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt. Mit dem anderen Aliquot wurde mit Hilfe des Abbott IMX die Ferritinbestimmung durchgeführt. Der Abbott-IMX ist ein Analysator, zur automatisierten Durchführung des Mikropartikelenzym Immunoassay und des Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassays. Der Assay beruht auf der Technik des Mikropartikel-Enzymimmunoassays (MIA). Die verdünnte Probe wird dabei über eine Probennadel-Elektrodeneinheit mit dem Verdünnungsmittel, dem Konjugat aus anti-Ferritin und alkalischer Phosphatase und den mit anti-Ferritin beschichteten Mikropartikeln in eine Inkubationskammer überführt. Das markierte Anti-Ferritin, das Ferritin und die Mikropartikel binden aneinander unter Ausbildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Ein Aliquot wird über eine Glasfibrermatrix überführt. Die Mikropartikel werden irreversibel an die Glasfibrermatrix gebunden. Nach einer Entfernung von ungebundenen Materialien durch Waschen der Matrix wird das Substrat 4-Methylumbelliferyl-phosphat auf die Matrix

gegeben. Die Phosphatase spaltet von dem Reagenz das Phosphat ab und bildet eine fluoreszierende Substanz, die fluorimetrisch erfaßt werden kann.

Als Referenzen dienten kommerzielle Kalibratoren (Ferritin-Konzentration von 0-1000 ng/mL, Fa. Abbott) sowie Kontroll-Substanzen (Ferritin-Konzentration von 20 ng/ml – 400 ng/ml, Fa. Abbott).

3.11 Radioimmunoassay zur Bestimmung des 6-Ketoprostaglandins F_{1a}

Mit Hilfe eines Radioimmunoassays wurden die 6-Keto-PGF_{1α}-Konzentrationen im Zellüberstand bestimmt. Im Radioimmunoassay werden radioaktiv markierte Antigene zur Mikroanalyse eingesetzt. Der Probe des zu bestimmenden Antigens, also dem Metaboliten 6-Keto-PGF_{1α} wird dabei eine definierte Menge tritiummarkierten Antigens (Beta-Strahler, β ®, DuPont de Nemours) beigemischt. Nach dem Zufügen eines antikörperhaltigen Testserums (Sigma Immuno Chemicals) konkurrieren die beiden Antigenspezies (kompetitiver Radioimmunoassay) um die limitierten Bindungsstellen des Antiserums. Die ungebundenen Reaktionspartner wurden durch Absorption an Kohle (Norit A, Fa. Serva) entfernt. Letzten Endes wurde die radioaktive Intensität in Form von erzeugten Lichtblitzen in einem Flüssigkristallmedium bestimmt (Szintillation). Je höher die Antigenkonzentration der Probe ist, um so geringer ist der Anteil des im Immunkomplex gebundenen radioaktiv markierten Antigens, desto niedriger ist die Intensität der Szintillation.

Für jede Meßreihe wurde eine Eichkurve mittels eines Standards angelegt, anhand derer das Zählgerät die gemessenen Lichtblitze in der unbekanntenen Probe quantifizieren konnte.

Die Endothelzellen wurden in 25 cm²-Kulturflaschen angesetzt und bis zur Konfluenz wachsen gelassen.

Die Zellen wurden zweimal mit je 3 mL sterilem Wasch-PBS gewaschen und anschließend für 6 Stunden mit nLDL 300 mg/dL +/- Inhibitor (s. Ergebnisse) versetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne LDL angesetzt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Nach Ende der Inkubationsdauer wurde der Zellüberstand entnommen und sofort mit Butylhydroxytoluol (Endkonzentration: 0,002 %) versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -78°C gelagert. Der Zellrückstand wurde erneut zweimal mit je 3 mL Wasch-PBS gewaschen. Darauf folgend wurde zu dem Zellrückstand genau 1 mL kaltes

destilliertes Wasser gegeben und der Ansatz bei -20°C eingefroren. Der Rückstand wurde zweimalig aufgetaut und wieder eingefroren, um eine vollständige Zellzerstörung zu gewährleisten. Das Zellysate wurde in Reagiergefäße überführt und für 5 Minuten bei 13.000 Umdrehungen/ Minute (entsprechend 35.000 g) zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde zur Proteinbestimmung nach Lowry wie 3.3.3 aufgeführt verwendet.

Durch Verdünnung des 6-Keto-PGF_{1 α} -Standards (Sigma) mit RIA-Puffer (Puffer F) wurde eine Standardreihe mit folgenden Konzentrationen erstellt (Angaben in pg/100 μl):

1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9.

Zunächst wurde die Zahl der maximal möglichen „Counts“ bestimmt. Dazu wurde das radioaktiv markierte Antigen (3H)- 6-Keto-PGF_{1 α} (DuPont, Bad Homburg, Deutschland) mit RIA-Puffer so verdünnt (ad 100 μL „Tracer“), daß nach der Zugabe einer definierten Menge an BSA-Puffer (Puffer G), die der Gesamtheit an Serumalbuminpufern in den Probenmischungen entsprach, eine Strahlung von 4000 cpm ergab.

Um unspezifische Bindungen zu erfassen, wurde das gleiche Marker-Puffer-Gemisch (= 100 μL „Tracer“) mit 100 μL RIA-Puffer (Probenmedium) und 300 μL BSA-RIA-Puffer versetzt (Doppelbestimmung).

Zur Erfassung der maximalen Bindungskapazität der Antikörper wurde der „Tracer“ (100 μL) mit 200 μL BSA-RIA-Puffer, 100 μL RIA-Puffer und 100 μL Antikörper-Lösung miteinander gemischt (Doppelbestimmung). (Antikörperlösung: Antikörper gegen 6-Keto-PGF_{1 α} (Sigma Immuno Chemicals) verdünnt mit RIA-BSA-Puffer, so daß sie 30-40 % des zugegebenen (3H)-6-Keto-PGF_{1 α} binden konnten.)

Die Standardreihe setzte sich zusammen aus 100 μL Standard, 200 μL BSA-Puffer, 100 μL Antikörper-Lösung und 100 μL „Tracer“.

100 μL der mit RIA-Puffer verdünnten Proben wurden mit 200 μL BSA-Puffer, 100 μL der Antikörperlösung und 100 μL der „Tracer“-lösung versetzt und gemischt.

Die Gemische wurden 20 Stunden bei 5°C inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen Reaktionspartner wurde (mit Ausnahme des Gemisches zur Bestimmung der maximal möglichen Counts) jeweils 200 μL RIA-Kohle zugefügt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde 10 Minuten bei 11.000 g zentrifugiert. Es wurden jeweils 590 μL des Überstandes abgenommen und im Zählgefäß mit 8 mL Szintillator (rotiszint® 221, Roth, Deutschland) gemischt und im „Counter“ (LKB Wallace, 1211 Rockbeta, Liquid Szintillator

Counter) gemessen. Die Meßzeit für jeden Zählvorgang eines Gefäßes wurde auf sechs Minuten eingestellt.

Als Grundlage für die Bestimmung des Meßbereiches diente die Standardkurve abzüglich eines Ungenauigkeitsbereiches von 10 % vom oberen und unteren Wert. Das unterste Detektionslimit lag bei 10 pg/mL.

Die Konzentration im Überstand errechnete sich aus der Formel:

$C \times F \times 100$ (Einsatz von 100 μ l) [pg/ml]; C = gezählte Lichtblitze, F = Verdünnungsfaktor

3.12 Statistische Analyse

Die adhärennten Monozyten (Kapitel 3.2) wurden mit 30 Aufnahmen pro Loch mit Hilfe einer Videokamera (Sony SSM-930 CE) erfaßt und mittels einer Bildanalysesoftware (Image Analyst v. 9.1.1. Acuity Imaging, Inc.) quantitativ erfaßt. Es wurde jeweils der Mittelwert der 30 Bilder ermittelt. Der Ansatz wurde jeweils 6-fach ausgelegt.

Die Werte wurden jeweils auf den unstimulierten Ansatz bezogen und diese dann statistisch analysiert mit Hilfe der statistischen Analysesoftware StatView, Version 5.01 von SAS Institute Inc, Cary. Statistische Vergleiche wurden mit Hilfe eines ANOVA-Post Hoc , gefolgt von einem Scheffe f-Test bzw. Fisher PLSD-Test ermittelt. Der ANOVA-Post Hoc vergleicht den Unterschied der Mittelwerte. Der Fisher-PLSD-Test führt alle möglichen paarweise Vergleiche mit einer mehrfachen t-Statistik durch. Der Sheffe-Test ist dagegen konservativer und stabiler gegen Ausreißer.

Alle Werte wurden mit dem mittleren Standardfehler (S.E.M.) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Adhäsionsversuche

In in-vitro-Versuchen mit der kultivierten humanen Endothelzelllinie (ECV-304) und Monozyten der humanen Zelllinie THP-I sollten die Effekte von Salicylsäurederivaten bei gleichzeitiger Stimulation der Endothelzellen auf die Adhäsion der Monozyten gezeigt werden.

Zur Stimulation der Endothelzellen wurde in Vorversuchen zunächst die optimale Konzentration des Stimulators bestimmt. Die für die Adhäsionsversuche geeignete Konzentration des TNF- α war bereits aus vorherigen Versuchen bekannt.

Um die optimale Konzentration von nLDL bzw. oxLDL für die Stimulation der Endothelzellen zu ermitteln, wurde zunächst eine Versuchsreihe mit ansteigenden nLDL- bzw. oxLDL-Konzentrationen durchgeführt. Dargestellt werden diese Ergebnisse in Abbildung 15 bzw. 16. Es wird deutlich, daß bis zu einem Maximum eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung vorliegt. Dieses Maximum lag bei der durch nLDL hervorgerufenen Stimulation der Endothelzellen bei 300 mg/dL. Bei oxLDL fand sich ein Maximum bei 30 mg/dL.

Nach dem Erreichen des jeweiligen Maximums sank die Anzahl adhärrender Monozyten wieder ab. Anschließende Untersuchungen der Lebensfähigkeit der Endothelzellen deuteten darauf hin, daß bei Konzentrationen über 300 mg/dL nLDL bzw. 30 mg/dL die Toxizität auf die Zellen deutlich anstieg.

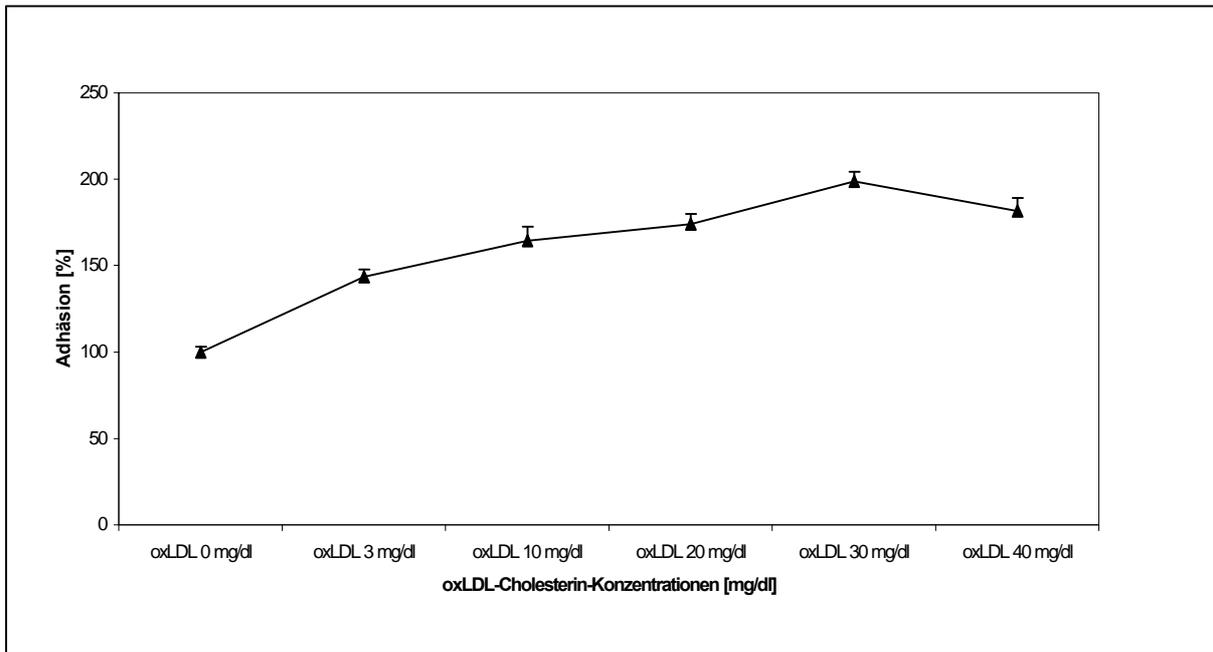


Abb. 15 *Einfluß von oxLDL Konzentrationen auf die Adhäsion von Monozyten bei einer Inkubationsdauer von vier Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 6 Versuchen + S.E.M..*

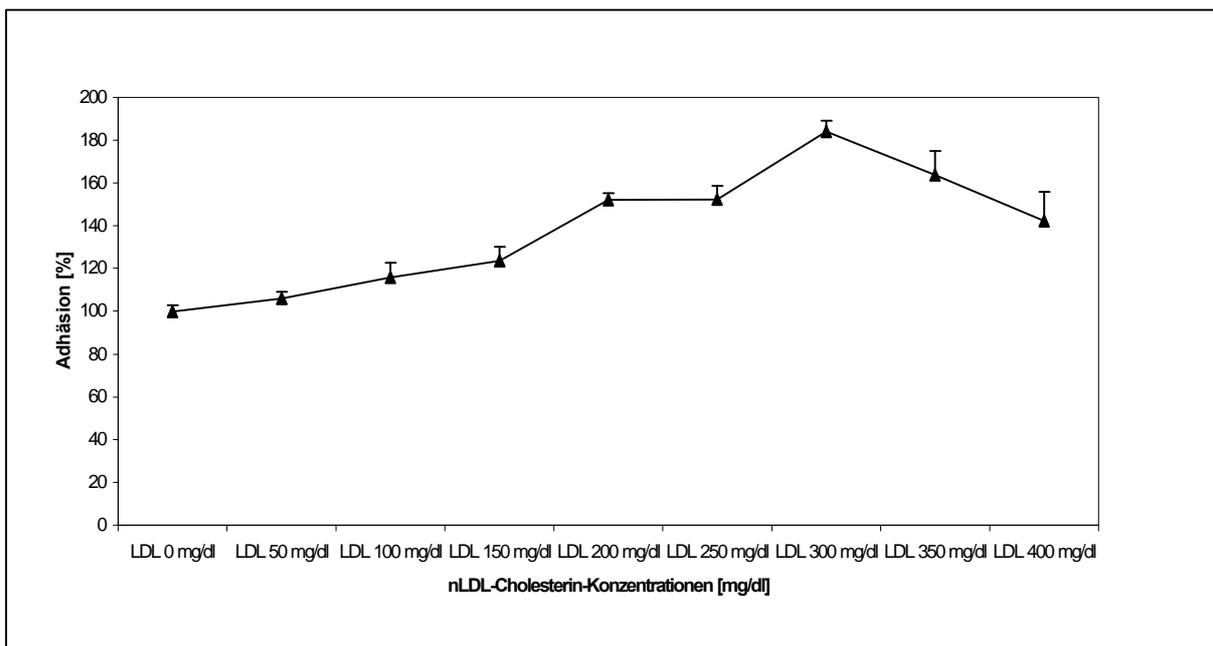


Abb. 16 *Einfluß von nLDL Konzentration auf die Monozytenadhäsion nach einer Inkubation der Endothelzellen mit nLDL für vier Stunden. Ein Maximum stellt sich bei 300 mg/dL nLDL dar. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 6 Versuchen + S.E.M..*

Darüber hinaus wurde überprüft, welchen Effekt die Triglyceride in den isolierten LDL-Proben auf die Stimulation der Endothelzellen haben könnten (Abb. 17). Nach dem Ermitteln der Triglyceridkonzentration aus den LDL-Stämmen und dem Umrechnen der Konzentration bei dem jeweiligen Versuch, wird offensichtlich, daß die Stimulation der Endothelzellen nicht signifikant von der Konzentration der Triglyceride abhängt. Der Mittelwert der Triglyceridkonzentrationen betrug 256 ± 8 mg/dl.

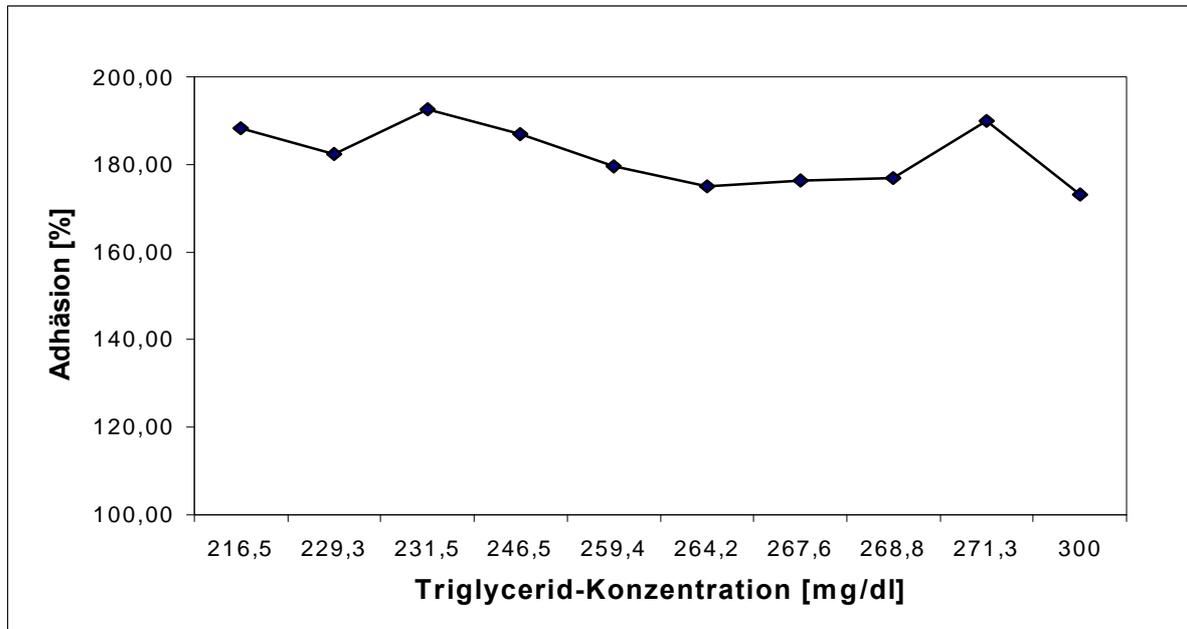


Abb. 17 *Einfluß der Triglycerid-Konzentration auf die Adhäsion von Monozyten an stimulierten Endothelzellen.*
Die Ordinate stellt die Zahl adhärrierender Monozyten in Prozent bezogen auf den unstimulierten Ansatz dar, die Abszisse die jeweilige Triglycerid-Konzentration bei dem Adhäsionsversuch. Die Menge an Triglyceriden (229,3 mg/dl vs. 300 mg/dL) scheint bei dem Versuchsaufbau keine signifikante Rolle zu spielen (182,5 % vs. 173,09 %). Die Adhäsionswerte sind bei den Triglyceridkonzentrationen nicht signifikant unterschiedlich.

4.1.1 Adhäsionsversuche mit Salicylaten und Ibuprofen

Nach Ermittlung der optimalen Stimulationsbedingungen wurde zunächst die Wirkung der Cyclooxygenasehemmer auf die Adhäsion der Monozyten auf mit 200 U/mL Tumornekrosefaktor- α stimulierte Endothelzellen untersucht (Abb. 18).

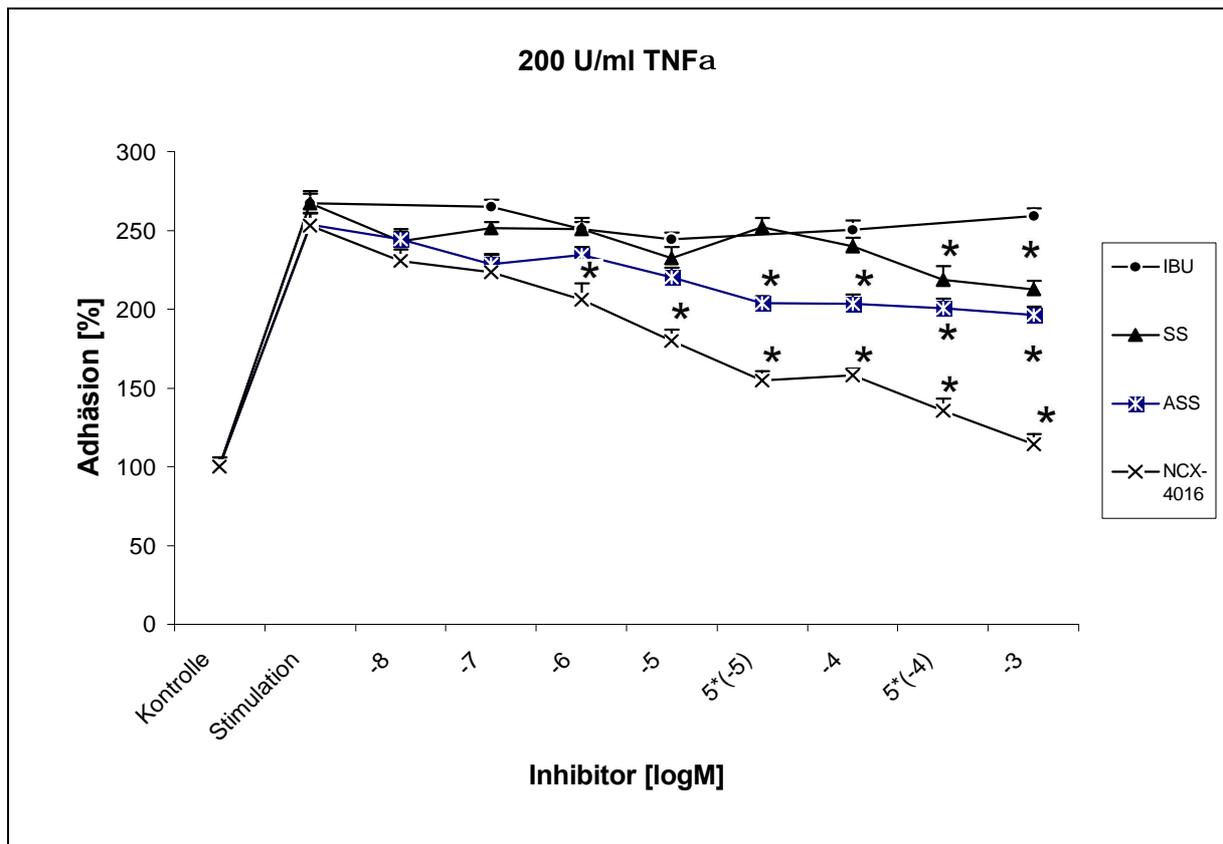


Abb.18 Effekte von Ibuprofen, Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und der NO-Acetylsalicylsäure NCX-4016 auf die Monozytenadhäsion nach gleichzeitiger Inkubation der Endothelzellen mit 200 U/mL TNF- α . Die Ordinate stellt die Zahl adhärrierender Monozyten in Prozent bezogen auf den unstimulierten Ansatz dar. Für die statistische Analyse wurden die umgerechneten Einzelwerte ($n=6$) verwendet und einem Scheffe-Test unterzogen. Dargestellt wurden die Mittelwerte \pm S.E.M.
* $P < 0,05$ gegen Stimulation

Die Anzahl der adhärrierenden Monozyten ließ sich durch Stimulation der Endothelzellen mit 200 U/mL TNF- α auf ungefähr 250 % gegenüber der Kontrolle (entsprechend 100 %) steigern.

Durch eine gleichzeitige Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α und einem Salicylsäurederivat, wurde die Zahl der am Endothel haftenden Monozyten reduziert.

Die Monozytenadhäsion wurde durch die Substanz NCX-4016 bereits in der Konzentration von 1 μ M signifikant (206 \pm 10 %) gegenüber der Stimulation (253 \pm 8 %) reduziert. Die Hemmung der Stimulation der Endothelzellen durch NCX-4016 war bis zu 1 mM konzentrationsabhängig (114 \pm 7 %).

Die Stimulation wurde ebenfalls durch ASS inhibiert, jedoch war diese erst ab 50 μM signifikant gegenüber der Stimulation (204 \pm 4% vs. 253 \pm 8). 1mM ASS reduzierte die Zahl adhärerender Monozyten auf 196 \pm 6 %.

Die Stimulation der Zelllinie wurde durch Salicylsäure in 0,5 millimolarer Konzentration signifikant gehemmt. Ibuprofen hatte keine erkennbare Effekte auf die durch $\text{TNF-}\alpha$ induzierte Monozytenadhäsion.

Abbildung 19 stellt die Effekte der Salicylate (Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und NCX-4016) sowie des Propionsäurederivates Ibuprofen auf die Zahl der an durch 300 mg/dL stimulierten Endothelzellen haftenden Monozyten dar.

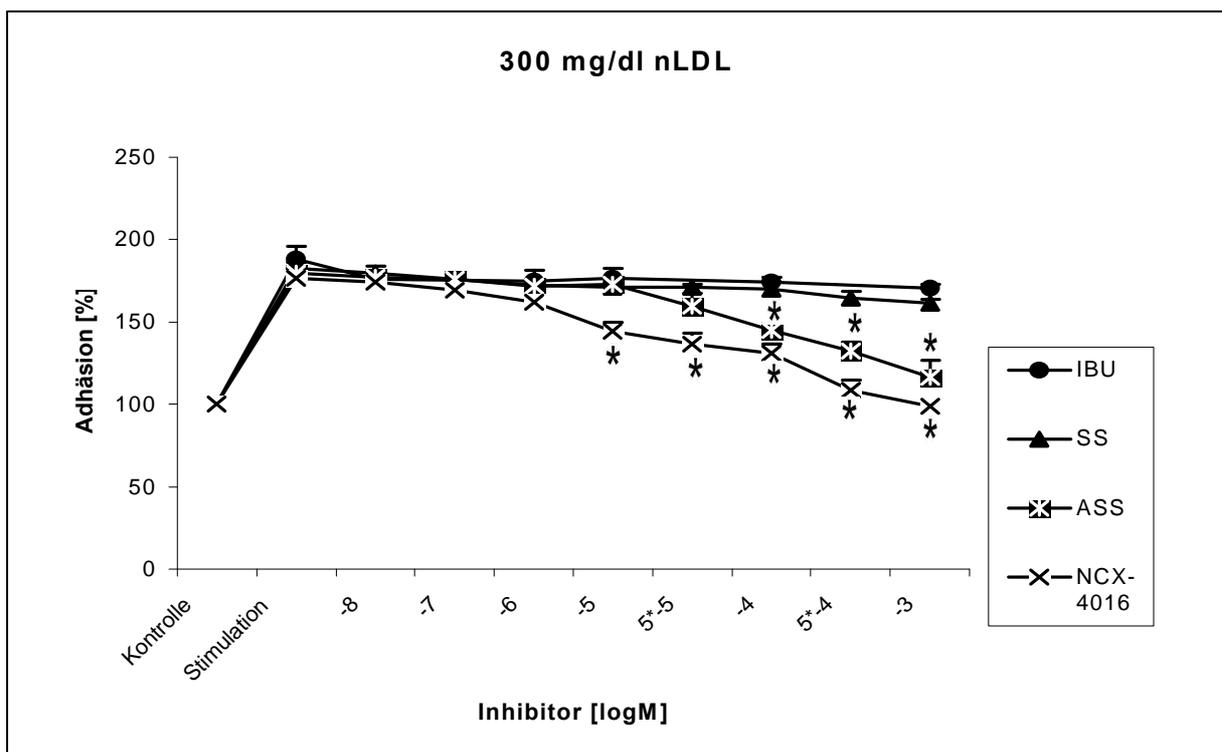


Abb. 19 Effekte von Ibuprofen, Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und der NO-Acetylsalicylsäure NCX-4016 nach gleichzeitiger Inkubation der Endothelzellen mit 300 mg/dL nLDL. Aufgetragen wurde die Zahl adhärerender Monozyten in Prozent bezogen auf den unstimulierten Ansatz (100 \pm 2 %) gegen die Konzentration an Inhibitor. Zur statistischen Analyse wurden die umgerechneten Einzelwerte ($n=6$) verwendet und ein Scheffe-Test durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M.

* $p < 0,05$ gegen Stimulation

Das nLDL verursachte durch Anregung der Endothelzellen eine Zunahme der Zahl der adhärenen Monozyten auf ca. 180 +/- 5 %. Diese konnte durch Zugabe 10 µM NCX-4016 signifikant auf 144 +/- 6 % (Scheffe, $p < 0,05$ gegen Stimulation) gesenkt werden. Bis zur Konzentration von 1 mM war die Hemmung durch NCX-4016 konzentrationsabhängig. Durch 1 mM NCX wurden fast wieder Basalwerte (unstimulierte Ansätze) erreicht (99 +/- 2 %). Die Koinkubation der Endothelzellen mit 300 mg/dl nLDL, 1 mM NCX-4016 und 50 µM Xanthin + 0,5 U/ml Xanthinoxidase (X-XOD) ließ die Monozytenadhäsion wieder signifikant auf 205 +/- 12 % gegenüber dem Ansatz mit nLDL/ NCX-4016 ansteigen (Daten nicht dargestellt).

ASS verringerte die durch nLDL ausgelöste Zahl der am Endothel adhärenen Monozyten signifikant auf 145 +/- 4 % (Scheffe, $p < 0,05$) in der Konzentration 0,1 mM. Durch Inkubation der Endothelzellen mit 300 mg/dL nLDL, 1 mM ASS und 50 µM Xanthin + 0,5 U/ml Xanthinoxidase wurde die prozentuelle Zahl adhärenen Monozyten wiederum signifikant gegenüber des Ansatzes nLDL/ ASS auf 220 +/- 13 % gesteigert (Daten nicht dargestellt).

Salicylsäure und Ibuprofen hatten keinen signifikanten Effekt auf die Adhäsion der Monozyten am stimulierten Endothel.

Durch Stimulation von Endothelzellen mit 30 mg/dL oxLDL wurde eine Steigerung der Adhäsion von Monozyten auf ungefähr 195 +/- 6 % hervorgerufen (Abb. 20).

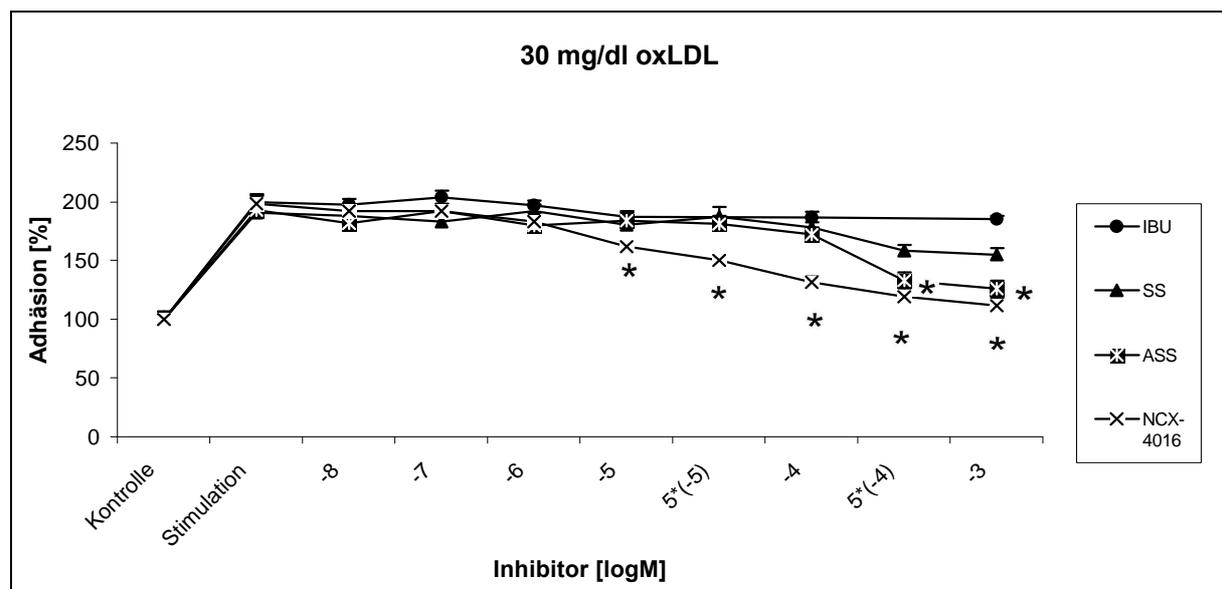


Abb. 20 Effekte von Ibuprofen (IBU), Salicylsäure (SS), Acetylsalicylsäure (ASS) und der NO-Acetylsalicylsäure NCX-4016 nach gleichzeitiger Inkubation der Endothelzellen mit 30 mg/dL oxLDL. Die umgerechneten Werte wurden einem Scheffe-Test unterzogen. Dargestellt wurden die Mittelwerte +S.E.M.. * $p < 0,05$ gegen Stimulation

Diese Stimulation durch oxLDL wurde durch gleichzeitige Inkubation mit 10 μM NCX-4016 signifikant reduziert (162 \pm 4 %, Scheffe, $p < 0,05$ gegen Stimulation). 1 mM des NO^{\bullet} -Donators bewirkte sogar eine Reduktion der Zahl adhärrierender Monozyten auf 112 \pm 7 %. 0,5 mM ASS inhibierte die durch oxLDL verursachte Stimulation der Endothelzellen signifikant auf 133 \pm 7 % (Scheffe, $p < 0,05$ gegen Stimulation).

Durch Salicylsäure und Ibuprofen konnte keine signifikante Reduktion erzielt werden.

Die Hemmung der durch Stimulation mit oxLDL ausgelösten gesteigerten Zahl der adhärrierenden Monozyten war durch NCX-4016 und ASS konzentrationsabhängig.

4.1.2 Adhäsionsversuche mit Referenzsubstanzen

Um die Effekte der Salicylate bewerten und denkbare Wirkmechanismen einstufen zu können, wurden Adhäsionsversuche mit 300 mg/dl nLDL und Referenzsubstanzen durchgeführt, die antioxidative (Vitamin C, Vitamin E, N-Acetylcystein, Tiron, Superoxiddismutase \pm Katalase), komplexierende (Deferoxamin) oder hemmende Eigenschaften auf die Funktion von Enzymen, die Sauerstoffradikale bilden (Allopurinol), bzw. auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κB (Pyrolidindithiocarbamat) haben.

Durch die Inkubation der Endothelzellen mit dem Eisenfänger Deferoxaminmesilat (Abb. 21) (100 μM) wurde die durch nLDL bewirkte Stimulation (189 \pm 6 %) signifikant auf 164 \pm 3,25 %, reduziert (Abb. 21, 23). Der antiadhäsive Effekt durch das Abfangen von Eisenionen konnte durch eine 24 stündige Vorinkubation sogar noch verstärkt werden (142% \pm 4,3).

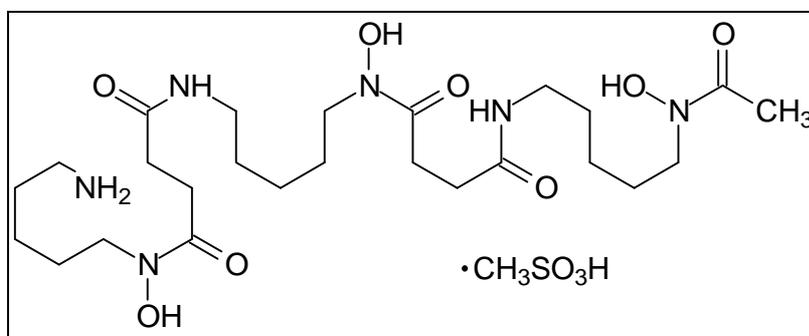


Abb. 21 Strukturformel von Deferoxaminmesilat

Die Überlegung, daß das Superoxidradikal intrazellulär vor allem durch die Xanthinoxidase gebildet wird und daß eine Hemmung dieses Enzyms über den antioxidativen Effekt die Monozytenadhäsion am stimulierten Endothel vermindert, führte zu dem Versuch einer Inkubation der ECV-Zellen mit dem Xanthinoxidasehemmer Allopurinol [Abb. 22]. Die Adhäsion wurde durch 0,5 mM Allopurinol tatsächlich signifikant auf 152 ± 6 % verringert [Abb. 23].

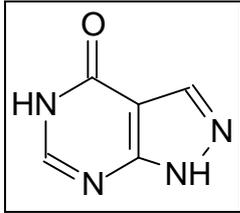
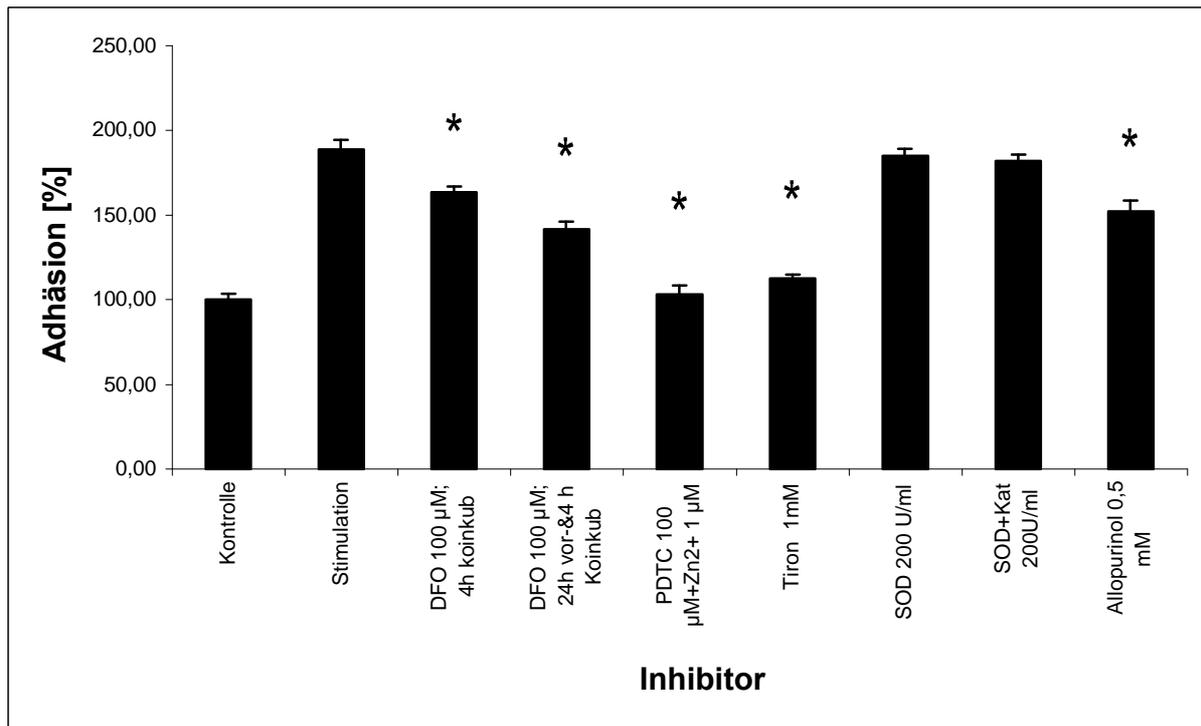


Abb. 22 Strukturformel von Allopurinol

Durch Inkubation mit dem zelleigenen antioxidativen Enzym Superoxiddismutase (SOD, EC 1.15.1.1, 200 U/mL) und auch durch die Kombination mit Katalase (Kat, EC 1.11.1.6, 200 U/mL) wurde die Adhäsion nicht beeinflusst. Das Enzym Superoxiddismutase katalysiert die Reaktion

$2 \text{O}_2^{\bullet -} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$, wobei das immer noch stimulierende Wasserstoffperoxid freigesetzt wird. Deshalb erfolgte der Versuch der Koinkubation mit der Katalase, welches die Reaktion $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ katalysiert, wobei das Wasserstoffperoxid eliminiert wird.



*Abb. 23 Effekte von den Deferoxamin (DFO mit 24 h Vorinkubation und anschließend vier stündige Koinkubation und DFO vier stündige Koinkubation), PDTC, Tiron, Allopurinol Superoxiddismutase und Superoxiddismutase + Katalase bei gleichzeitiger Inkubation der Endothelzellen mit 300 mg/dL nLDL. DFO, PDTC, Allopurinol und Tiron zeigten signifikante Effekte. Die umgerechneten Werte (n=6) wurden einem Fisher-Test unterzogen. Dargestellt wurden die Mittelwerte +Standardfehler d. Mittelwerte. * $p < 0,05$ gegen Stimulation.*

Tiron [Abb. 24] ist ein Catecholsulfonsäurederivat, welches Metallionen abfängt, die radikalische Redoxreaktionen katalysieren können. Das Metallion wird durch das Tiron komplexiert. Eisen(III)-Ionen werden vom Tiron in einem Eisen(III)-tris-tironat-Komplex gebunden. Desweiteren ist das Tiron bekannt als chemischer Superoxidradikal-Fänger. Eine ein millimolare Tironlösung reduzierte die Monozytenadhäsion signifikant auf 112 +/- 3 % [Abb. 23].

Einen vielversprechenden Angriffspunkt zur Unterbrechung der endothelialen Reaktion auf nLDL stellt die Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B dar. Das Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) [Abb. 24] ist ein starker Inhibitor der Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors. Durch 0,1 mM PDTC und 1 μ M Zinkchlorid wurde die Adhäsion der Monozyten auf 103 + 5 % signifikant reduziert [Abb. 23].

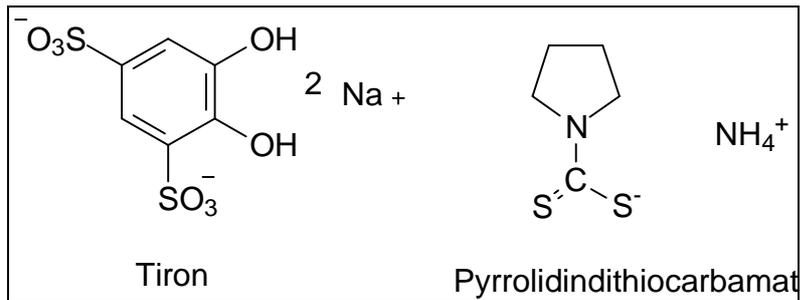


Abb. 24 Strukturformeln von Tiron und PDTC

Um die Wirkungen von klassischen Antioxidantien auf die Monozytenadhäsion an stimulierten Endothelzellen zu untersuchen, wurden die Endothelzellen mit 300 mg/dL nLDL und mit Acetylcystein, Tocopherolacetat bzw. Ascorbinsäure koinkubiert (Abb. 5)

Sowohl Vitamin C als auch Vitamin E zeigten signifikant reduzierende Effekte auf die Monozytenadhäsion in 100 μ molarer Konzentration.

Durch Tocopherolacetat (Vitamin E) wurde die Zahl der adhärierenden Monozyten auf 105 +/- 7 % signifikant gegenüber der Stimulation (193 +/- 27 %) reduziert.

Ascorbinsäure (Vitamin C) verringerte die Monozytenadhäsion auf 123 +/- 6 %, 20 mM N-Acetylcystein auf 145 +/- 3 %.

Von Vitamin C und Vitamin E wurde zusätzlich noch die Dosis-Wirkungs-Beziehung untersucht. Während 25 μ M Vitamin C bzw. Vitamin E keinen signifikanten Einfluß auf die Zahl der adhärierenden Monozyten hatte, zeigten 50 μ M der betreffenden Substanzen deutliche Effekte (Vitamin C: 143 +/- 5%, Vitamin E: 124 +/- 4 %) [Abb. 25].

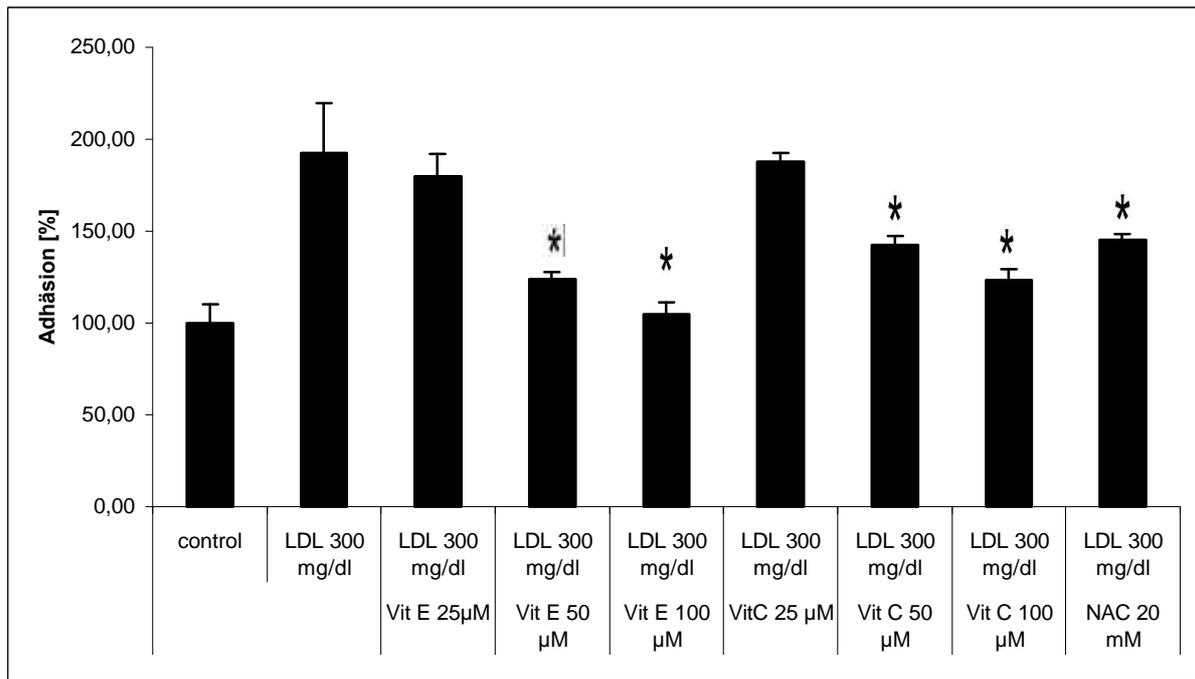


Abb. 25 *Einfluß der Antioxidantien Ascorbinsäure, Tocopherol und N-Acetylcystein auf die Monozytenadhäsion bei gleichzeitiger Inkubation der Endothelzellen mit 300 mg/dL nLDL.*

Die umgerechneten Werte (n=6) wurden einem Scheffe-Test unterzogen.

Dargestellt wurden die Mittelwerte +/- S.E.M..

** p < 0,05 gegen Stimulation*

In weiteren Versuchen wurden die Monozyten mit ansteigenden Konzentrationen an Acetylsalicylsäure für vier Stunden inkubiert (Abb. 26). Zeitlich parallel wurden die Endothelzellen mit 300 mg/dl nLDL stimuliert. Im Anschluß wurden die Monozyten und die Endothelzellen mehrfach gewaschen und wie unter 3.2. weiter verfahren. Die Zahl der am stimulierten Endothel adhärenen Monozyten wurde durch Acetylsalicylsäure in den Konzentrationen ab 0,5 mM signifikant herabgesetzt 173 +/- 5 % gegenüber Stimulation 192 +/- 12 %.

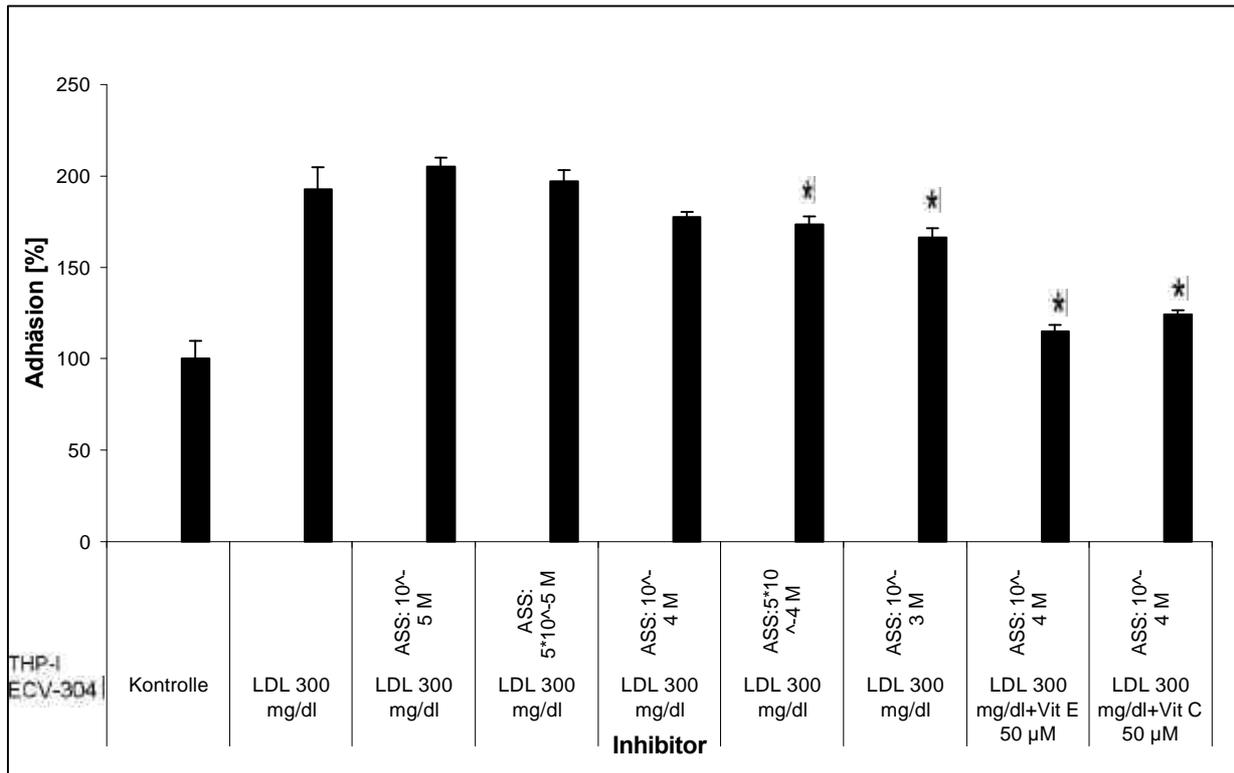


Abb. 26 *Einfluß von Acetylsalicylsäure nach Inkubation der Monozytenlinie THP-I. Signifikant ist die Hemmung der Adhäsion bei Konzentrationen ab $5 \cdot 10^{-4}$ M. Die Antioxidantien Ascorbinsäure und Tocopherol reduzieren die Adhäsion bei gleichzeitiger Inkubation der Endothelzellen mit 300 mg/dL nLDL noch weiter. Die umgerechneten Werte ($n=6$) wurden einem Fisher-Test unterzogen. Dargestellt wurden die Mittelwerte + Standardfehler der Mittelwerte
* $p < 0,05$ gegen Stimulation*

Durch eine Inkubation der Monozyten mit Acetylsalicylsäure und der Endothelzellen mit 50 µM Vitamin E wurde die Zahl der Monozyten auf 115 +/- 5 % reduziert. Durch 50 µM Vitamin C konnte die Monozytenadhäsion auf 124 +/- 2 % erniedrigt werden, wenn die Monozyten zeitgleich mit 0,1 mM Acetylsalicylsäure inkubiert wurden.

Um die Wirkungen des NCX-4016 mit denen anderer NO[•]-Donatoren vergleichen zu können, wurden Adhäsionsversuche mit Glyceroltrinitrat und Isosorbiddinitrat durchgeführt (Abb. 27, 28).

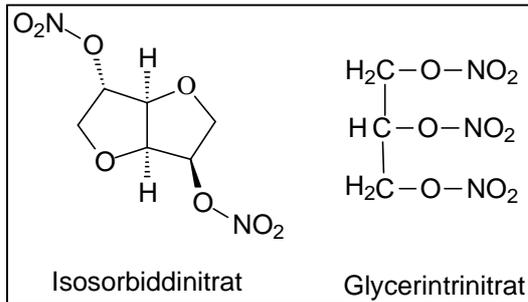


Abb. 27 Strukturformeln von ISDN und GTN

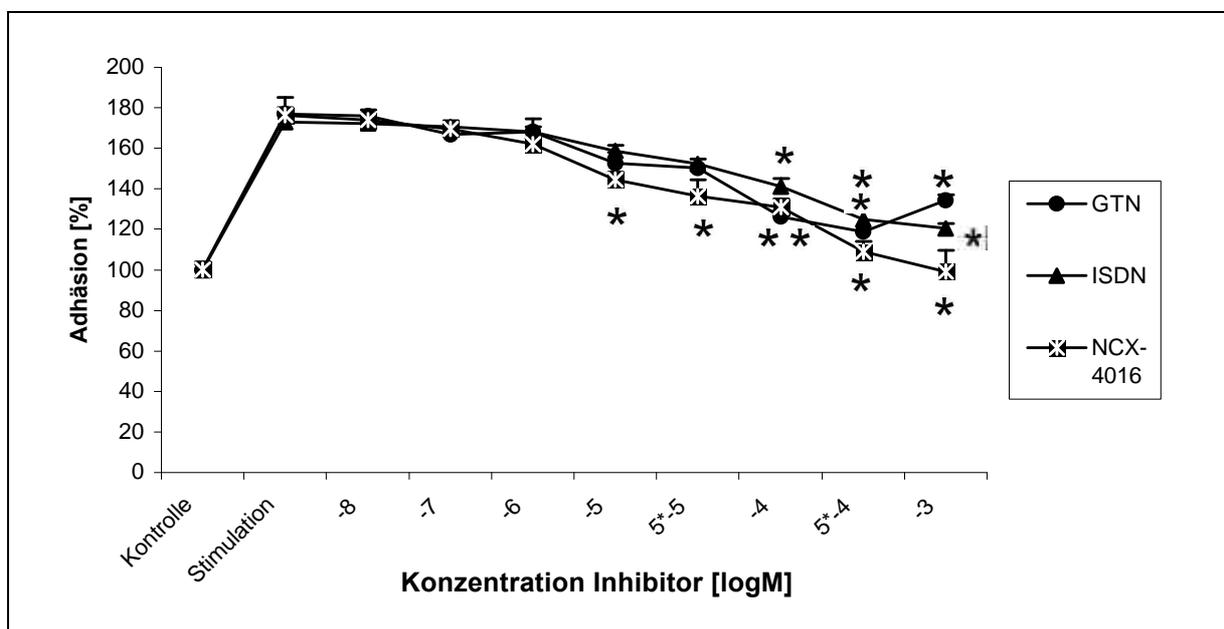


Abb. 28 Effekte von den NO[•]-Donatoren Glyceroltrinitrat (GTN), Isosorbiddinitrat (ISDN) und der NO-Acetylsalicylsäure NCX-4016 nach gleichzeitiger Inkubation der Endothelzellen mit 300 mg/dL nLDL. Die umgerechneten Werte (n=6) wurden einem Scheffe-Test unterzogen. Dargestellt wurden die Mittelwerte +S.E.M..
 * $p < 0,05$ gegen Stimulation

Glyceroltrinitrat verringerte die Monozytenadhäsion bis 0,5 mM konzentrationsabhängig 0,1 mM GTN setzte die Zahl der adhärierenden Monozyten signifikant auf 127 +/- 4 % gegenüber der Stimulation (177 +/- 3 %) herab. Durch weitere Konzentrationssteigerung stieg überraschenderweise die Zahl der adhärierenden Monozyten wieder an: 1mM GTN: 134 +/- 2 %

Die Monozytenadhäsion wurde ebenfalls durch Isosorbiddinitrat konzentrationsabhängig verringert. In der Konzentration von 0,1 mM ist dieser Effekt auf die Monozyten signifikant gegenüber der Stimulation (141 +/- 5 % gegenüber 173 +/- 5%).

Um den Einfluß endogenen Stickstoffmonoxids auf die Monozytenadhäsion zu untersuchen, wurden die Endothelzellen zunächst 24 Stunden in L-Arginin-freiem Medium und dann mit dem NO[•]-Synthasehemmer ADMA inkubiert (Abb. 29). Für diesen Versuch wurden die Endothelzellen mit 10 µM und 100 µM ADMA angesetzt. Im Anschluß wurden die Monozyten zugefügt und wie oben beschrieben weiter verfahren.

Die Zahl der adhärierenden Monozyten stieg signifikant gegenüber dem unstimulierten Ansatz (100 +/- 11 %) an. 10 µM ADMA erhöhte die Zahl adhärrender Monozyten auf 144 +/- 3 %; durch 100 µM ADMA wurde sie sogar auf 151 +/- 5% angehoben.

Andererseits war von Interesse, ob die Zugabe des Substrats der NO[•]-Synthase, L-Arginin den durch Hemmung der NO[•]-Synthase mit ADMA hervorgerufenen Anstieg der Adhäsion wieder aufheben kann [Abb. 29]. Dafür wurden die Endothelzellen mit jeweils 1 mM L-Arginin und der jeweiligen Konzentration an ADMA inkubiert. Der durch ADMA verursachte Anstieg der adhärierenden Monozyten war auch nach L-Arginin-Gabe noch signifikant gegenüber dem unstimulierten Ansatz (100 µM ADMA + 1 mM L-Arginin: 119 +/- 13 %, 10 µM ADMA + 1 mM L-Arginin: 128 +/- 5 %), jedoch war auch die durch das L-Arginin bewirkte Verminderung des durch ADMA verursachten Anstiegs der Zahl adhärierenden Monozyten signifikant.

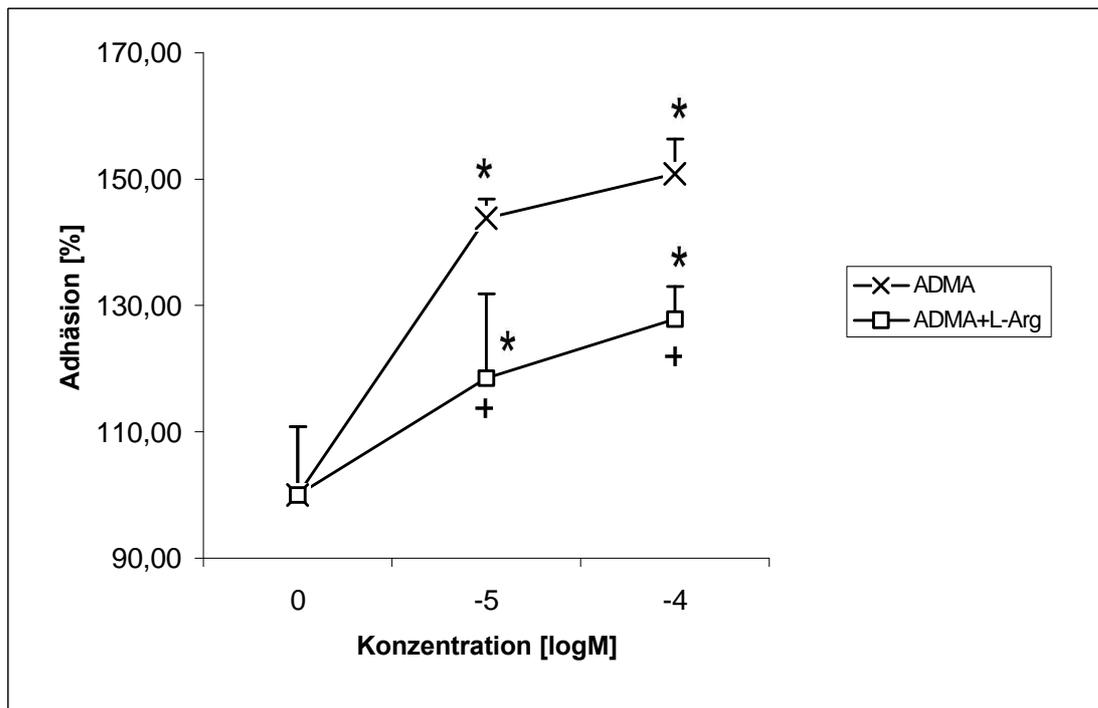


Abb. 29 Effekte von den ADMA und ADMA + 1 mM L-Arginin auf die Monozytenadhäsion. Die umgerechneten Werte ($n=6$) wurden einem Fisher-Test unterzogen. Dargestellt wurden die Mittelwerte + Standardfehler der Mittelwerte

- * $p < 0,05$ gegen unstimulierten Ansatz;
- + $p < 0,05$ gegen Ansatz ohne L-Arginin

4.2 Nitritfreisetzungsversuche

Um einschätzen zu können, wieviel Stickstoffmonoxid aus den Substanzen Glycerintrinitrat, NCX-4016, ISDN und L-Arginin in Gegenwart von Endothelzellen freigesetzt wird, wurden diese Substanzen mit den ECV-Zellen für sechs Stunden inkubiert. Der Metabolit Nitrit wurde aus dem Zellüberstand mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt und auf den Zellrückstand (Protein) bezogen. Als Versuchsmedium und Kontrolle diente Phosphatpuffer. Parallel dazu wurden in einem getrennten Versuch die Inkubationslösungen separat im Brutschrank (5 % CO_2 , 37°C) aufbewahrt, um Nitrit als Maß für abgespaltenes NO^\bullet aus dem Zerfall der Substanzen ermitteln zu können. Es war jedoch kein Nitrit aus dem Zerfall zu messen, so daß man annehmen kann, daß das gemessene Nitrit vollständig aus der Reaktion

der Zellen mit den NO[•]-Donatoren hervorgeht. Der Ansatz mit Glyceroltrinitrat (5,74 µM Nitrit/ mg Protein nach 6 Stunden) zeigt eine fast dreifach höhere Nitritfreisetzung (Abb. 30) als die vom NCX-4016 (2,2 µM Nitrit/ mg Protein nach 6 Stunden) und vom ISDN (2,6 µM Nitrit/ mg Protein nach 6 Stunden). Dies entspricht der Erwartung. Die Freisetzung von Nitrit aus ISDN ist vergleichbar mit der vom NCX-4016. Offensichtlich wird nur eines der beiden verfügbaren Nitratgruppen zur Bildung von Stickstoffmonoxid verwendet. L-Arginin zeigte hier keinen Effekt, der über den Kontrollwert hinausgeht.

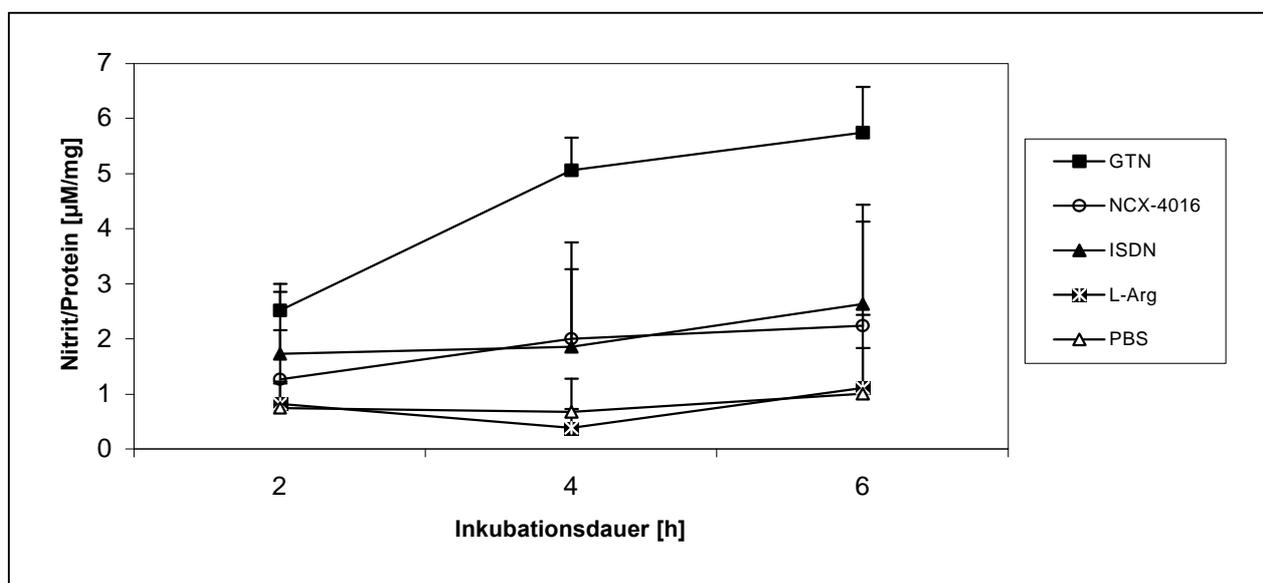


Abb. 30 Nitritfreisetzung aus NO[•]-Donatoren bzw. dem Substrat der endogenen NO[•]-Synthase L-Arginin durch Endothelzellen nach Inkubation der Zellen mit 100 µM des betreffenden Stoffes gelöst in PBS. Als Vergleich zu endogen gebildetem Nitrit diente der PBS-Ansatz. Separat wurden die Lösungen o.a. Stoffe im Brutschrank inkubiert und Proben zu den betreffenden Zeiten genommen [n=4]. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (+ Standardabweichung vom Mittelwert) der Proben (n=4; bei der Kontrolle: n=16)

4.3 „Enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) für das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1)

Mit Hilfe eines enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) für VCAM-1 sollte überprüft werden, inwieweit sich die Inkubation der Endothelzellen mit nLDL und den Cyclooxygenasehemmern auf die Expression des redoxsensitiven vaskulären Zelladhäsionsmoleküls-I auswirkt (Abb. 31).

Die Transkription und Expression des VCAM-I wird über einen redoxsensitiven Mechanismus gesteuert.

20.000 Endothelzellen je Loch wurden, wie im Methodenteil bereits beschrieben, in 96 Loch-Platten angesetzt und 24 Stunden im Brutschrank belassen. Anschließend wurden die Zellen für vier Stunden mit 150 mg/dL nLDL stimuliert und mit den betreffenden Cyclooxygenasehemmer koinkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und der ELISA wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Der stimulierte Ansatz wurde auf 100 % umgerechnet.

Salicylsäure zeigte einen schwach ausgeprägten hemmenden Effekt auf die VCAM-I-Expression, der konzentrationsabhängig, jedoch nicht signifikant war (100 μ M SS: 82 +/- 29 %; 1mM: 73 +/- 20 %).

Acetylsalicylsäure wies ebenfalls eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die durch nLDL hervorgerufene VCAM-1-Expression auf (10 μ M ASS: 78 +/- 30 %; 100 μ M: 59 +/- 37 %); 1 mM ASS verringerte die VCAM-I-Expression signifikant auf -4 +/- 37 %.

In einem „Gegenversuch“ wurden die mit nLDL stimulierten Zellen mit Acetylsalicylsäure und dem Superoxid-generierenden System Xanthin/ Xanthinoxidase (50 μ M Xanthin + 0,5 U/mL Xanthinoxidase) inkubiert. Die Expression stieg signifikant gegenüber dem Ansatz ohne Xanthin/ Xanthinoxidase an (110 +/- 37 %).

Die durch nLDL gestiegene VCAM-I-Expression wurde durch das NCX-4016 ebenfalls konzentrationsabhängig vermindert (10 μ M NCX-016: 68 +/- 26 %; 100 μ M: 42 +/- 28 %) und in der Konzentration 1 mM signifikant (-8 +/- 9%).

Während alle Salicylsäurederivate einen, wenn auch nicht immer signifikanten Einfluß auf die VCAM-I-Expression hatten, zeigte das Propionsäurederivat Ibuprofen keinen Effekt auf die VCAM-I-Expression .

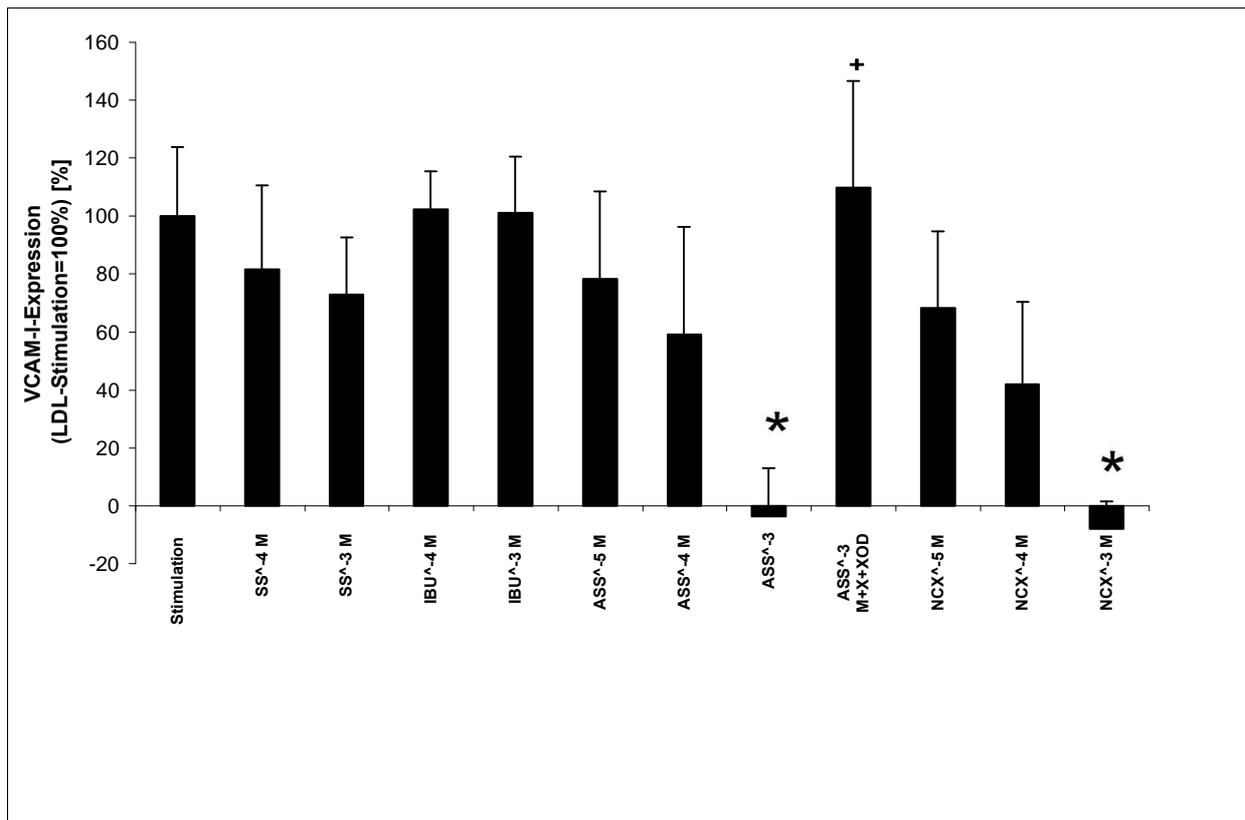


Abb. 31 ELISA für VCAM-I nach Inkubation von Endothelzellen mit 150 mg/dl nLDL und Salicylsäure (SS, 10^{-4} – 10^{-3} M), Ibuprofen (IBU, 10^{-4} – 10^{-3} M), Acetylsalicylsäure (ASS, 10^{-5} – 10^{-3} M; 10^{-3} M + 50 μ M Xanthin + 0,5 U/ml Xanthinoxidase) und NCX-4016 (NCX, 10^{-5} – 10^{-3} M). Dargestellt wurden die Mittelwerte in Prozent bezogen auf die maximale Stimulation (150 mg/dL nLDL) + S.E.M. Die Statistik wurde mit dem Fischer-Test durchgeführt.
* $p < 0,05$ gegen Stimulation
+ $p < 0,05$ gegen ASA 10^{-3} M

4.4 Bestimmung des 8-iso-Prostaglandin F_{2a} als einen Indikator für oxidativen Streß

Die Messung der Isoprostane (8-iso-PGF_{2 α}) dient als eine Methode zur Bestimmung des oxidativen Stresses. Das 8-iso-Prostaglandin F_{2 α} wird unabhängig von der Cyclooxygenase (Prostaglandin H₂-Synthase, EC 1.14.99.1) über einen Peroxidationsweg aus Arachidonsäure gebildet.

Die Endothelzellen wurden für 6 Stunden mit 300 mg/dL nLDL und dem jeweiligen Salicylat bzw. Ibuprofen inkubiert. Anschließend wurde der Zellüberstand entnommen und für die Bestimmung des 8-iso-Prostaglandin F_{2 α} , wie im Kapitel 3.7 beschrieben, aufgearbeitet. Der

Zellrückstand wurde mehrfach vorsichtig gewaschen und für die Bestimmung des Proteins verwendet.

Innerhalb einer Arzneistoffreihe wurde immer nur eine LDL-Charge benutzt, um Artefakte durch im LDL vorhandene Isoprostane zu vermeiden.

Durch nLDL wurden signifikant mehr Isoprostane gegenüber der unbehandelten Kontrolle freigesetzt (240 +/- 10 % gegenüber 100 +/- 7 %) [Abb. 33].

Alle Salicylate reduzierten die durch nLDL gesteigerte 8-iso-PGF_{2α}-Freisetzung konzentrationsabhängig.

Die Reduktion durch Salicylsäure war auch in 1 mmolarer Konzentration nicht signifikant (203 +/- 12 %). Durch 100 μM Acetylsalicylsäure wurde signifikant weniger Isoprostan gebildet (179 +/- 5 %). 10 mM verringerte das gemessene Isoprostan auf 148 +/- 16 %.

Durch NCX-4016 wurde die Bildung des Isoprostans gleichfalls in 100 μmolarer Konzentration signifikant reduziert (147 +/- 16 %).

Durch Ibuprofen wurde die Freisetzung des Isoprostans nicht beeinflusst, selbst durch 1 mmolarer Konzentration nicht.

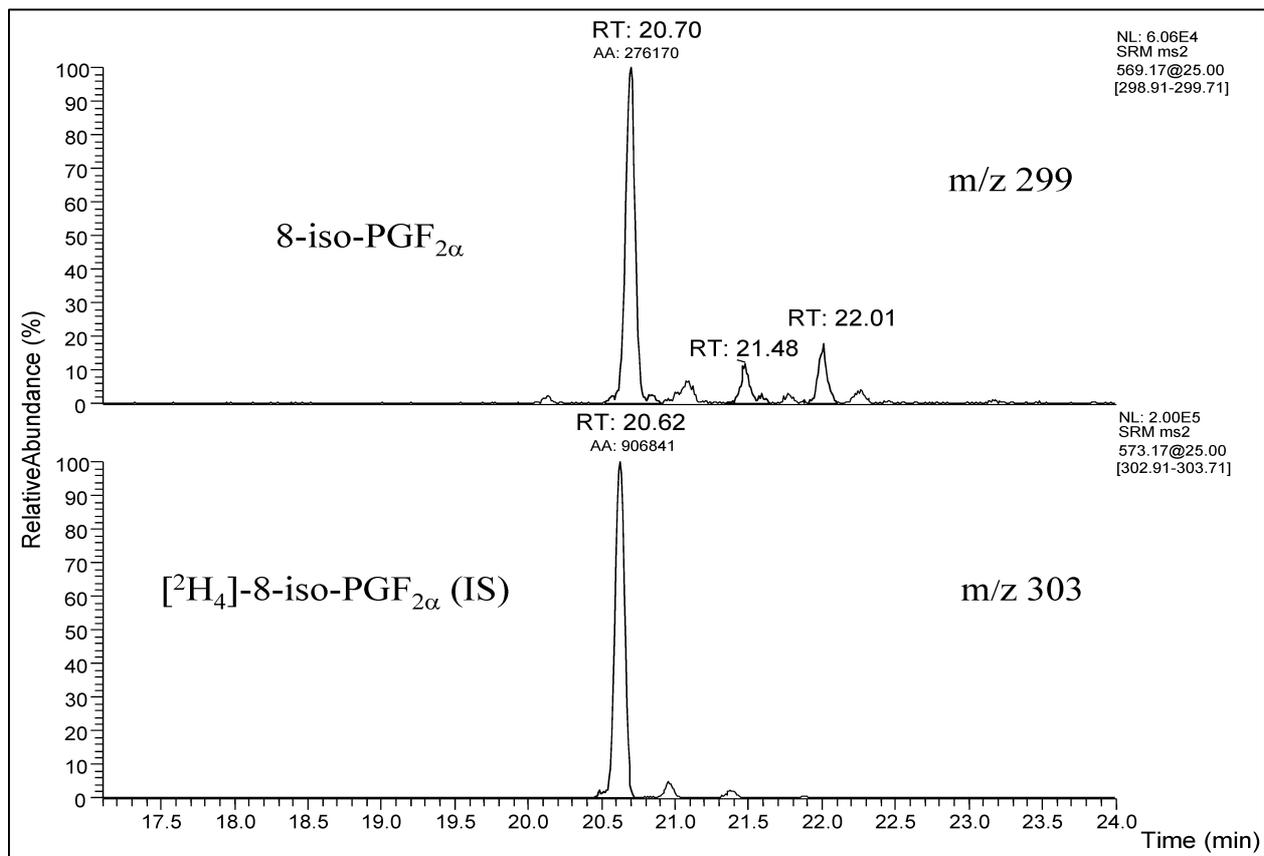


Abb. 32 GC-Tandem-MS-Analytik von 8-iso-PGF_{2α}. Gezeigt ist ein typisches Chromatogramm aus der Analyse einer Zellüberstandsprobe. SRM (selected-reaction monitoring) der Ionen mit m/z 299 für endogenes 8-iso-PGF_{2α} und m/z 303 für den internen Standard [²H₄]-8-iso-PGF_{2α} der PFB-TMS-Derivate.

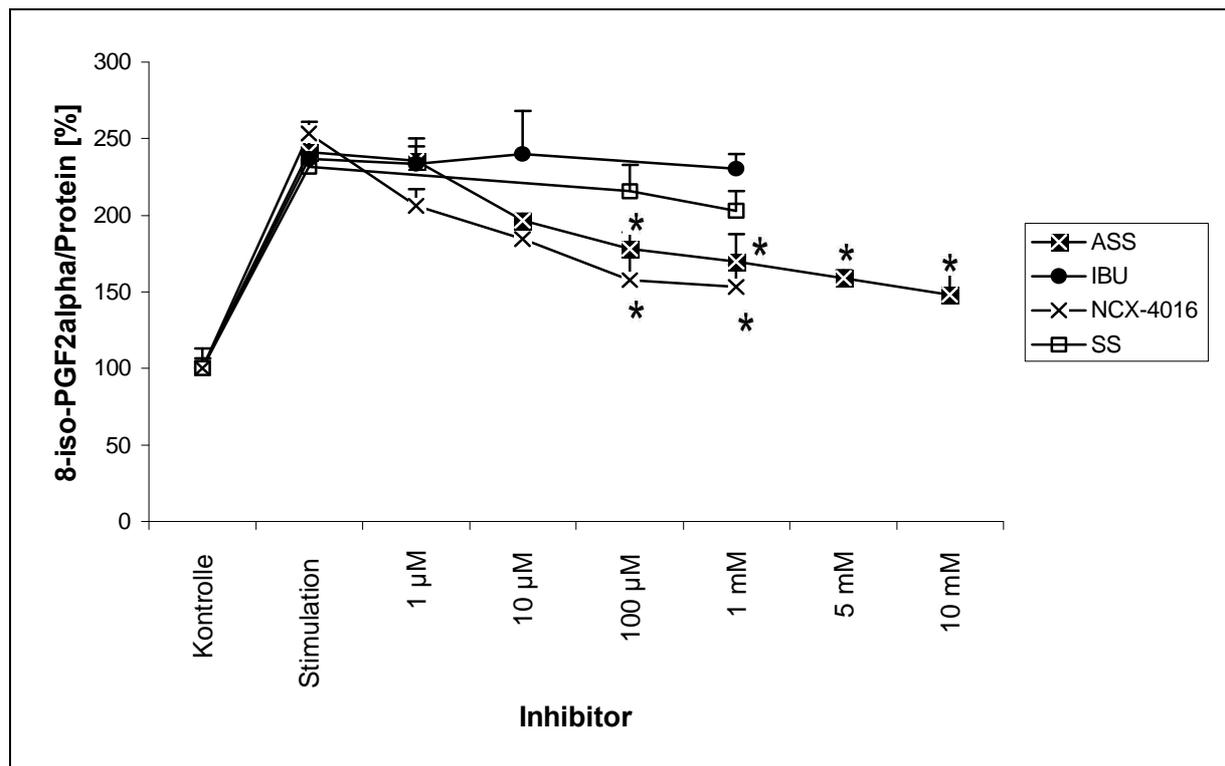


Abb. 33 *8-iso-PGF_{2α} nach Koinkubation von Endothelzellen mit 300 mg/dl nLDL und NCX-4016 (NCX, 10⁻³ - 10⁻⁶ M), Acetylsalicylsäure (ASS, 10⁻² - 10⁻⁶ M), bzw. Ibuprofen (IBU, 10⁻³ - 10⁻⁶ M) und Salicylsäure (SS 0,1 und 1 mM). Die durch nLDL ausgelöste gesteigerte Bildung von 8-iso-PGF_{2α} wurde durch Zusatz von NCX (ab 10⁻⁴ M) und ASS (ab 10⁻⁴ M) signifikant mit $p < 0,05$ gehemmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=4) bezogen auf den unstimulierten Ansatz in Prozent + S.E.M.. Zur statistischen Analyse wurden die Einzelwerte einem Scheffetest unterworfen.*

4.5 Bestimmung von 6-Ketoprostaglandin F_{1α}

Wie im Kapitel 4.3 dargestellt, verhinderten die Salicylate die Bildung des 8-iso-PGF_{2α}, während die Bildung des Isoprostans durch Ibuprofen nicht beeinflusst wird. Um zu überprüfen, ob die Bildung des Isoprostans tatsächlich, wie postuliert, auch von den Endothelzellen cyclooxygenaseunabhängig nach Stimulation stattfindet, wurden die ECV-Zellen für 6 Stunden mit den COX-Hemmern inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen unbehandelt angesetzt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Nach Ende der Inkubationsdauer wurde der Zellüberstand entnommen und sofort mit Butylhydroxytoluol (Endkonzentration: 0,002 %) versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung

bei -78°C gelagert. Der Zellrückstand wurde nach mehrfachem vorsichtigen Waschen für die Proteinbestimmung verwendet.

Alle Substanzen zeigten eine hemmende Wirkung auf die COX-abhängige 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ -Bildung (Abb. 34). ASS reduzierte das 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ von $6 \pm 0,5$ pg/mg Protein ab $0,1$ mM signifikant ($p < 0,05$, Bonferri-Dunn) auf $2,5 \pm 0,6$ pg/mg Protein, 10 mM sogar auf $0,7 \pm 0,1$ pg/mg Protein. Durch Salicylsäure wurde das 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ erst in 1 mmolärer Konzentration signifikant auf $2,2 \pm 0,4$ pg/mg Protein reduziert. $0,1$ mM Ibuprofen verminderte das 6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ signifikant auf $1,7 \pm 0,2$ pg/mg Protein, $0,1$ mM NCX-4016 auf $1,5 \pm 0,2$ pg/mg Protein.

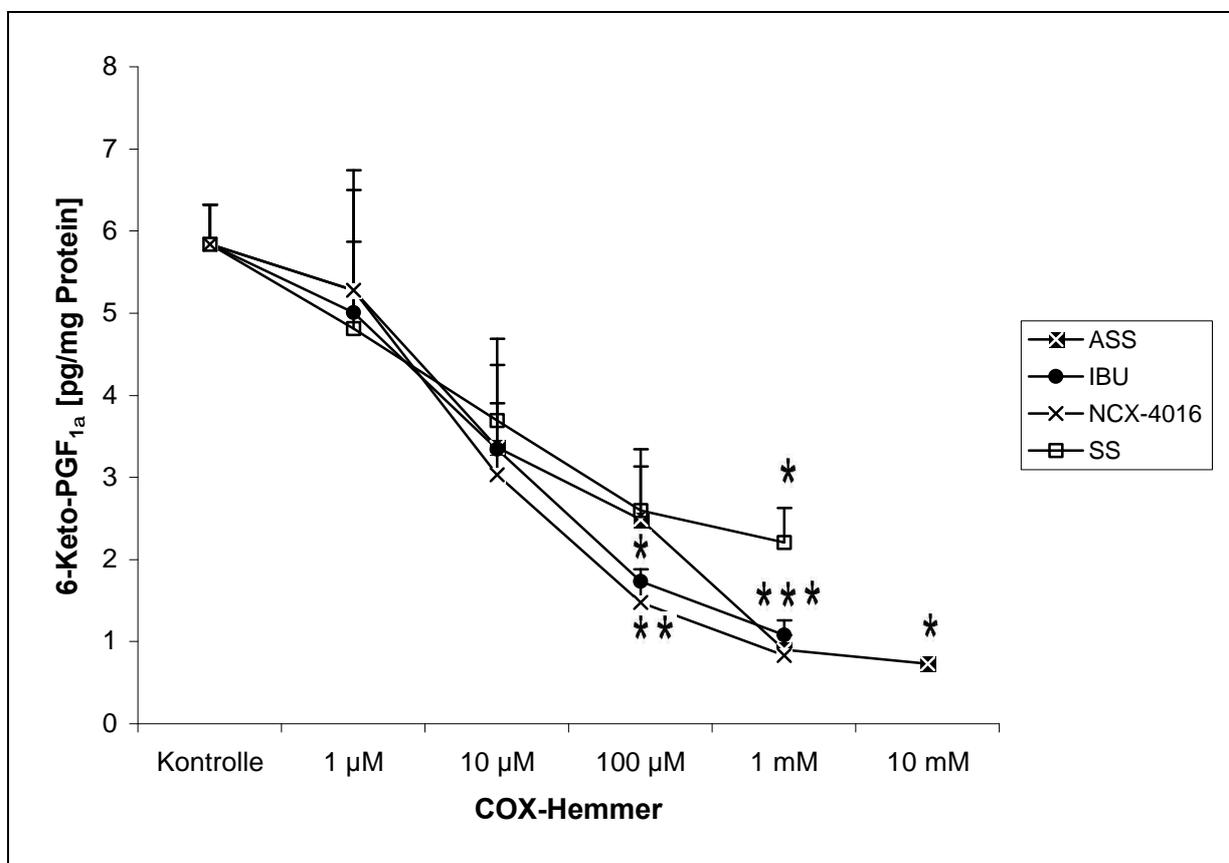


Abb. 34 *6-Keto-PGF $_{1a}$ nach Inkubation von Endothelzellen mit NCX-4016 (NCX), Acetylsalicylsäure (ASS) bzw. Ibuprofen (IBU) und Salicylsäure (SS). Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=4$) bezogen auf den unstimulierten Ansatz in Prozent + S.E.M.. Zur statistischen Analyse wurden die Einzelwerte einer Bonferri-Dunn-Korrektur für wiederholte Messungen unterworfen.*

4.6 Ferritin-Assay

Bereits frühere Studien zeigten, daß Salicylate die intrazelluläre Eisenkonzentrationen beeinflussen, möglicherweise durch Beeinflussung des zelleigenen Eisenregulatorproteins Ferritin. Dafür wurden die Endothelzellen vier Stunden mit Kontrollmedium, Aspirin, Salicylsäure, Ibuprofen, NCX-4016 und ISDN inkubiert. Der Zellrückstand wurde mit Aqua bidest. aufgenommen und mit Hilfe des Abbott IMX wie o.a. bestimmt.

Die Ergebnisse in Abbildung 35 zeigen, daß nur durch Acetylsalicylsäure eine Ferritinproteininduktion stattfand. Diese Induktion durch ASS war konzentrationsabhängig: 159 +/- 2,1 % (1 mmol/L ASS), 163,1 +/- 2,5 % (0,1 mmol/L ASS) und 151,6 +/- 0,8 % (0,01 mmol/L ASS) (signifikant für alle Konzentrationen: $p < 0,05$ für ASS gegen Kontrolle, Scheffe-Test). Das Desacetylderivat der ASS, die Salicylsäure hatte keine induzierende Effekte auf die Ferritinproteinsynthese (90,5 +/- 2,2 %, 0,1 mmol/L SS gegen Kontrolle). Ebenso hatte auch der nichtsteroidale antiinflammatorische Arzneistoff Ibuprofen keine Wirkung auf die Bildung von Ferritin (116,5 +/- 6,1 %, 0,1 mmol/L IBU gegen Kontrolle). Der NO[•]-Donator Isosorbiddinitrat hatte keinen induzierenden Effekt auf die Bildung des Ferritinproteins (97,2 +/- 2,1 %, 0,1 mmol/l ISDN gegen Kontrolle). Ähnliches beobachtet man auch bei dem NO[•]-Derivat der ASS, dem NCX-4016 (112,3 +/- 4,2 %, 0,1 mmol/L NCX-4016 gegen Kontrolle). Die Daten sind der Mittelwert +/- S.E.M. aus drei unabhängigen Versuchen und stellen die Induktionsverstärkung gegenüber der unbehandelten Kontrolle dar.

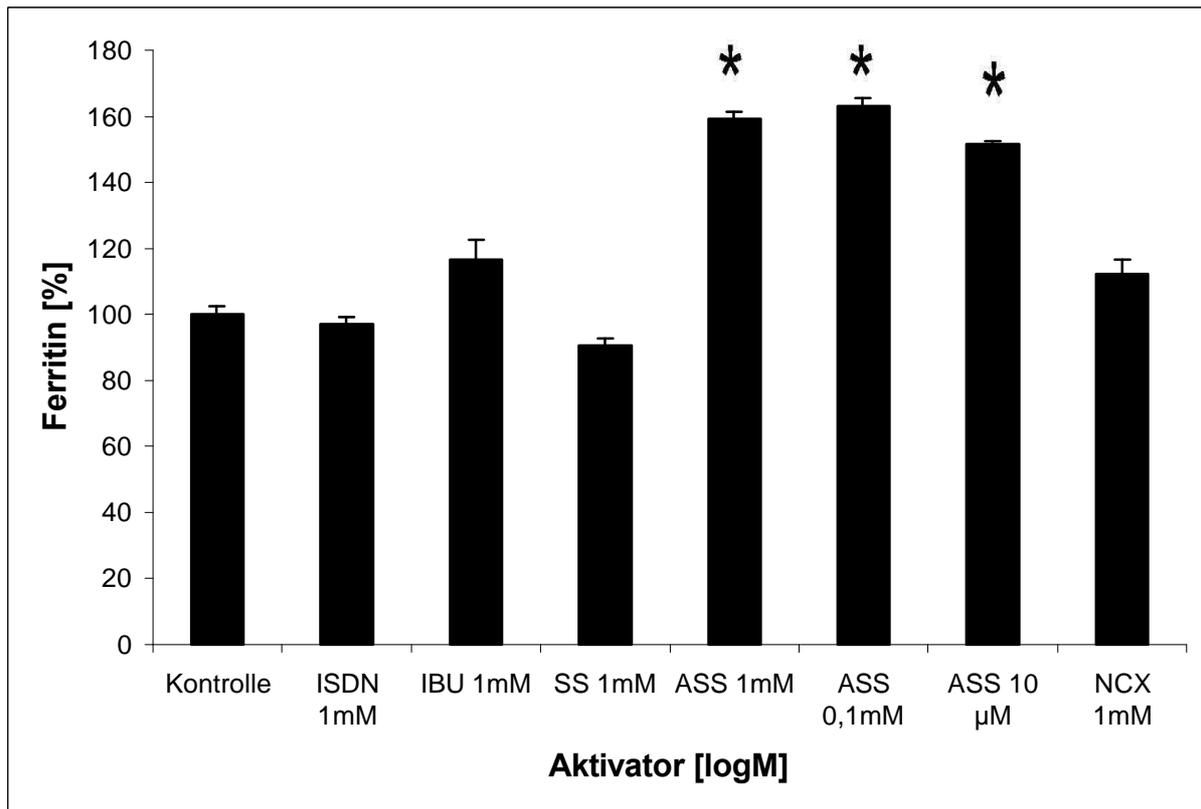


Abb. 35 Gebildetes Ferritin nach Inkubation von Endothelzellen mit Isosorbiddinitrat (ISDN), Ibuprofen (IBU), Salicylsäure (SS), Acetylsalicylsäure (ASS) und NCX-4016 (NCX) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte (n=4) bezogen auf den unstimulierten Ansatz in Prozent + S.E.M.. Zur statistischen Analyse wurden die Einzelwerte einer Bonferri-Dunn-Korrektur für wiederholte Messungen unterworfen.

4.7 “NF-κB-Gel-Shift-Assay”

Über den Transkriptionsfaktor NF-κB wird die Expression von Adhäsionsmolekülen vermittelt. Die Aktivierung des NF-κB findet u.a. durch intrazellulären oxidativen Streß wie z.B. nach Stimulation durch LDL statt.

Die ECV-Zellen wurden für vier Stunden mit 300 mg/dL nLDL und +/- 10⁻⁴ M Arzneistoff im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluß an die Inkubation wurden Kernextrakte hergestellt und diese nach der Methode von B. Schieffer, Labor für Molekulare Kardiologie der Medizinischen Hochschule Hannover aufgearbeitet und bestimmt.

Die Behandlung der Endothelzellen mit 300 mg/dL nLDL zeigt eine deutliche Aktivierung des NF- κ B (Abbildung 37). nLDL stimulierte die Bildung von NF- κ B signifikant (Fisher-Test, $p < 0,05$) auf 189,4 \pm 9,3 % (jeweils Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte) gegenüber der Kontrolle (100 \pm 4,8 %). Eine Koinkubation mit ASS hemmte die durch nLDL stimulierte NF- κ B -Synthese konzentrationsabhängig: 176,5 \pm 13,5 % (ASS 0,01 mmol/L gegen Kontrolle =100 %), 109,2 \pm 12,4 % (ASS 0,1 mmol/L gegen Kontrolle) und 176,5 \pm 13,5 % (ASS 1 mmol/L gegen Kontrolle), signifikant gegen nLDL bis ASS 0,1 mmol/L, Fisher-Test, $p < 0,05$. Ebenso hemmte auch Salicylsäure die durch nLDL-Stimulation hervorgerufene NF- κ B-Bildung konzentrationsabhängig, jedoch schwächer als ASS: 122,1 \pm 8,7 % (SS 1 mmol/L signifikant gegen nLDL, Fisher-Test, $p < 0,05$), 172,3 \pm 10,1 % (SS 0,1 mmol/L gegen Kontrolle). Salicylsäure zeigte in der Konzentration von 0,01 mmol/L keine Hemmwirkung mehr (191,7 \pm 8,3 % gegen Kontrolle). Ibuprofen hemmte selbst in der Konzentration von 1 mmol/L, die durch nLDL hervorgerufene Stimulation nicht (175,5 \pm 9,9 %). Der NO^{*}-Donator Isosorbiddinitrat hatte ebenfalls nur sehr schwach hemmende Wirkung (171,4 \pm 8,7 %, 1 mmol/L ISDN). Die Effekte des NO^{*}-donierenden ASS-Derivats NCX-4016 waren vergleichbar mit denen der Salicylsäure. Die Hemmung war ebenfalls konzentrationsabhängig: 121,2 \pm 5,2 % 1 mmol/L NCX-4016 gegen Kontrolle, 166,6 \pm 13,3 % 0,1 mmol/L NCX-4016 gegen Kontrolle und 201,4 \pm 16,2 % 0,01 mmol/L NCX-4016 gegen Kontrolle. Der hemmende Effekt von 1 mmol/L NCX-4016 war signifikant gegen der nur mit nLDL behandelten Probe (Fisher-Test, $p < 0,05$).

Der NF- κ B-Inhibitor Pyrroldindithiocarbamat (0,1 mmol/L) verringerte in Verbindung mit Zinkionen (1 μ mol/L) erwartungsgemäß die nLDL-induzierte Stimulation von NF- κ B signifikant (Fisher-Test, $p < 0,05$) wieder auf das Basal-Niveau (90,6 \pm 10,4 %). Die densitometrischen Daten sind der Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert von vier unabhängigen Versuchen und stellen die prozentualen Werte bezogen auf den unstimulierten Ansatz (Kontrolle = 100 %) dar.

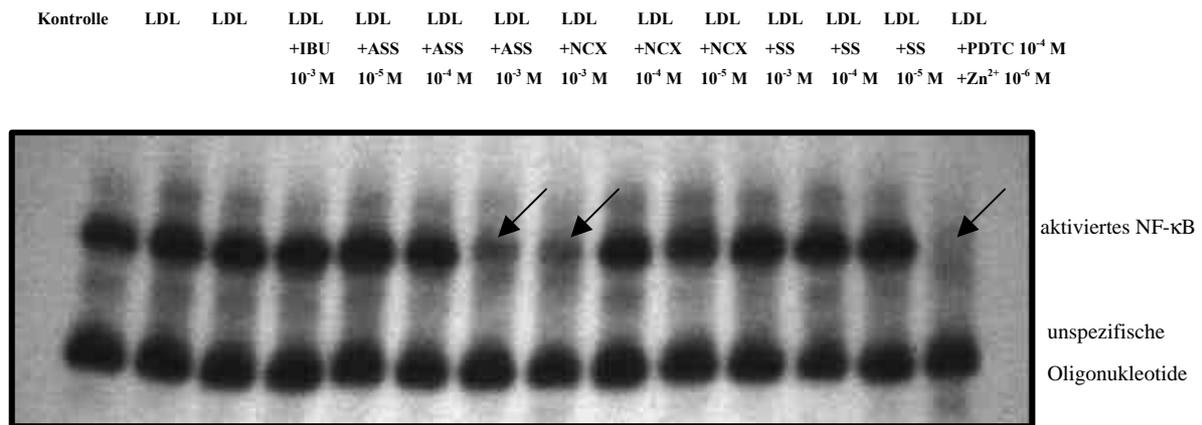


Abb. 36 Effekte von nLDL und den NSAIDs IBU, ASS, SS und NCX auf die NF-κB-Synthese. nLDL stimulierte deutlich die Bildung von NF-κB, die durch ASA (0,1 mmol/L und 1 mmol/L) und NCX (1 mmol/L) deutlich gehemmt wird. Als Gegenkontrolle dient die Inhibierung durch PDTC (0,1 mmol/L) + Zn²⁺ (1 μmol/L). Die Daten sind repräsentativ für vier separate Experimente mit ähnlichen Ergebnissen.

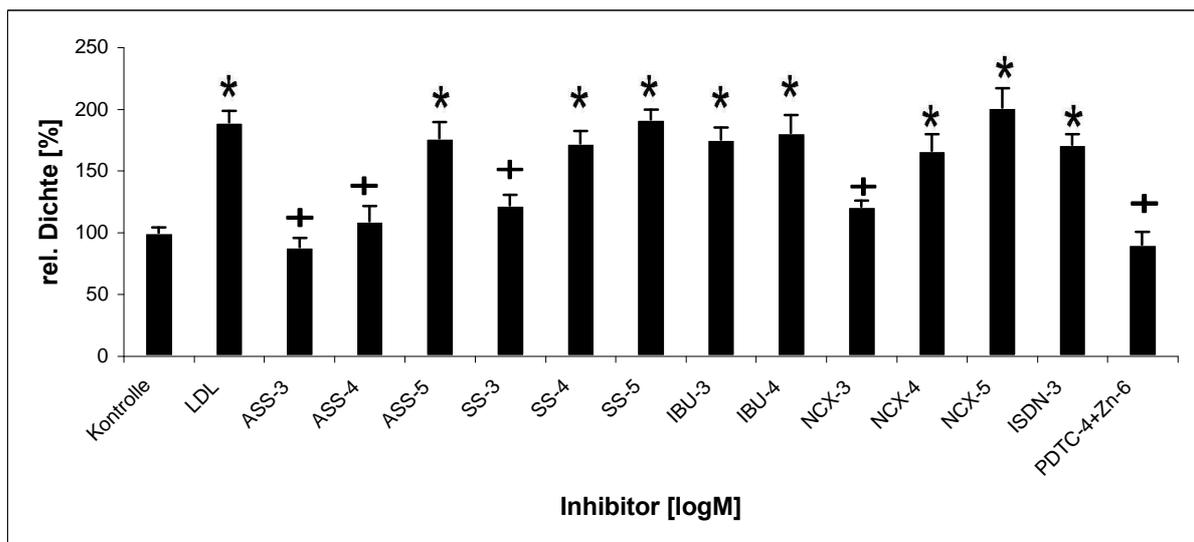


Abb. 37 Effekte von ASS (0,01 mmol/L, 0,01 mmol/L, 1 mmol/L), SS (0,01 mmol/L, 0,1 mmol/L, 1 mmol/L), IBU (0,1 mmol/L, 1 mmol/L), NCX-4016 (0,01 mmol/L, 0,1 mmol/L, 1 mmol/L) und ISDN (1 mmol/L) auf die durch 300 mg/dL nLDL hervorgerufene Stimulation der Bildung von NF-κB. Als Kontrolle diente der unstimulierte Ansatz. Die Daten sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen +/- Standardabweichung vom Mittelwert, bezogen auf die Kontrolle (100 %). Als Gegenkontrolle diente die Inkubation mit nLDL und PDTC (0,1 mmol/L) + Zn²⁺ (1 μmol/L). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Fischer-Tests ermittelt (* p < 0,05 gegen Kontrolle; + p < 0,05 gegen nLDL-Stimulation).

5 Diskussion

Die hier vorliegende Studie zeigt, daß die durch TNF- α -, nLDL- und oxLDL-Stimulation hervorgerufene Adhäsion von Monozyten an das Endothel hemmbar durch Salicylate ist.

Diese Hemmung ist von der Salicylatkonzentration und vom Salicylsäurederivat abhängig.

Ebenso bewirkt eine Koinkubation der Zellen mit Ascorbinsäure, Vitamin E, den NO \cdot -Donatoren GTN und ISDN, dem Eisenchelator Deferoxamin, dem Superoxidation-Radikalfänger Tiron und dem NF- κ B-Inhibitor Pyrrolidindithiocarbamat eine Hemmung der Adhäsion.

Eine Steigerung der Zahl adhärrierender Monozyten ließ sich durch Zugabe des NO \cdot -Synthase-Inhibitors ADMA bewiesen, die nach Zugabe von L-Arginin im Überschuß teilweise reversibel war.

Zentrale Ergebnisse der Studie sind:

- 1.) Die Zahl der an den Endothelzellen adhärrierenden Monozyten steigt mit zunehmender Konzentration des Stimulators (natives „low density lipoprotein“ (150 – 300 mg/dL) bzw. oxidiertes „low density lipoprotein“ (10 – 30 mg/dL).
- 2.) In Anwesenheit von LDL-Cholesterin (300 mg/dL) unterliegen die Endothelzellen einem oxidativen Streß. Dies ist als Anstieg der Bildung des Peroxidationsprodukts 8-iso-Prostaglandin F $_{2\alpha}$ nachweisbar.
- 3.) Durch die Antioxidantien N-Acetylcystein, Tiron, Tocopherolacetat und Ascorbinsäure konnte die Adhäsion von Monozyten an durch LDL stimulierte Endothelzellen verringert werden. Die Adhäsion wird über Adhäsionsfaktoren wie zum Beispiel das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-I (VCAM-I) vermittelt.
- 4.) Die Salicylate Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und NCX-4016 vermindern sowohl die durch TNF- α als auch die durch nLDL und oxLDL vermittelte Adhäsion der Monozyten. Durch diese Substanzen wurde ebenfalls die VCAM-I-Expression reduziert. Der hemmende Effekt auf die Monozytenadhäsion ist vergleichbar mit dem der Antioxidantien Ascorbinsäure, Tocopherolacetat, Pyrrolidindithiocarbamat und Tiron.

5.) Die Bildung des Peroxidationsprodukts 8-iso-PGF_{2α} von stimulierten Endothelzellen wurde durch die Salicylate reduziert.

Die Bildung des Cyclooxygenaseprodukts 6-Keto-PGF_{1α} wurde ebenfalls durch die Salicylate gehemmt.

Durch Ibuprofen wurde jedoch nur die Bildung des 6-Keto-PGF_{1α} inhibiert. Die durch Stimulation der Endothelzellen gesteigerte 8-iso-PGF_{2α}-Produktion wurde nicht durch Ibuprofen beeinflusst. Dies zeigt, daß die Bildung des 8-iso-PGF_{2α} Cyclooxygenase-unabhängig ist.

6.) Molekulare Mechanismen des antioxidativen Effekts von Acetylsalicylsäure und NCX-4016 könnten sein:

- a) Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB
- b) Beeinflussung der Ferritinsynthese

7.) Die NO[•]-Donatoren Glyceroltrinitrat und Isosorbiddinitrat reduzieren in diesem Versuchsaufbau die Adhäsion von Monozyten am stimulierten Endothel.

Die Hemmung der endogenen Stickstoffmonoxidbildung durch Hemmung der NO[•]-Synthese mit ADMA steigert die Adhäsion von Monozyten am unstimulierten Endothel. Diese Steigerung der Adhäsivität ist partiell reversibel, wenn die Zellen zuvor mit dem Substrat der NO[•]-Synthese, dem L-Arginin, inkubiert wurden.

Möglicherweise trägt die NO[•]-Freisetzung zu dem adhäsionshemmenden Effekt von NCX-4016 bei.

5.1 Effekte von nativem und oxidiertem „low density lipoprotein“-Cholesterin und Triglyceriden auf die Monozytenadhäsion und den oxidativen Stress

Die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen wurde sowohl durch natives LDL als auch oxidiertes LDL konzentrationsabhängig gesteigert. Dies entspricht Beobachtungen, die auch von anderen Arbeitsgruppen mit vergleichbaren Konzentrationen an Lipoprotein in vitro [170-173] gemacht wurden.

Ein signifikanter Einfluß von verschiedenen Triglyceridkonzentrationen auf die Adhäsion konnte bei diesem Aufbau der Studie nicht beobachtet werden. Dies schließt aber nicht aus,

daß erhöhte Triglyceride dennoch Effekte auf die Adhäsion haben können. Die Diskussion über deren Rolle bleibt also weiterhin kontrovers und einige Studien belegen, daß auch erhöhtes Triglycerid die VCAM-1-Expression stimuliert [174, 175].

5.2 Bedeutung des LDL bei oxidativen Prozessen

Entsprechend der Hypothese stieg mit zunehmender LDL-Konzentration der oxidative Streß in der Zelle an [75]. Dieser Anstieg an reaktiven Sauerstoffverbindungen zeigte sich anhand der Zunahme des Peroxidationsprodukts 8-iso-PGF_{2α}. Dieses wird im Gegensatz zu dem Prostacyclin Cyclooxygenase-unabhängig gebildet. Mit der Zunahme von reaktiven Sauerstoffverbindungen treten oxidative Veränderungen auf wie z.B. die Oxidation von Lipiden zu Lipidperoxiden. Auf diese Weise wird oxidiertes low density lipoprotein gebildet, welches Endothelzellen noch stärker als natives LDL stimuliert. Dies wurde auch durch die vorliegende Studie gezeigt: 30 mg/dL oxidiertes LDL steigerten die Adhäsion von Monozyten an das stimulierte Endothel in etwa so stark wie 300 mg/dL natives LDL. Der genaue Weg dieser LDL-Oxidation durch Endothelzellen ist jedoch noch nicht bekannt [176].

Durch die intrazellulären oxidativen Veränderungen findet u.a. eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB statt [177], über den auch die Expression von Adhäsionsmolekülen stattfindet [178].

Die Adhäsion von Monozyten an das Endothel wird ihrerseits durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Eine zentrale Rolle nimmt hier das redox-sensitive vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 ein [179]. Die Hochregulation der Expression dieses Oberflächenproteins erfolgt durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB [180]

5.3 Einfluß von Antioxidantien auf die Adhäsion von Monozyten am stimulierten Endothel

Die durch LDL verursachte gesteigerte Adhäsion der Monozyten an den Endothelzellen ließ sich durch gleichzeitige Inkubation der Endothelzellen mit Antioxidantien reduzieren. Diese Beobachtung machten auch [181-186]

In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß die durch LDL vermittelte Adhäsion über „oxidative Schritte“ stattfindet. Sowohl durch Tocopherolacetat als auch durch Ascorbinsäure wurde die Adhäsion signifikant inhibiert, wobei die Wirkung des lipophilen Tocopherolacetats bei gleicher Konzentration etwas stärker als die der Ascorbinsäure zu sein scheint. Die tendenziell stärkere Wirkung des Tocopherolacetats ließe sich möglicherweise dadurch erklären, daß es sich als lipophile Substanz in LDL-Partikel einlagern kann und somit die Veränderung des nLDL zum wesentlich stärker stimulierenden oxLDL schon im Vorfeld unterdrückt [187]. Die unterschiedliche Wirkung von Ascorbinsäure gegenüber Tocopherolacetat wird aber besonders in diesem Bereich zur Zeit verstärkt diskutiert [188-197]. Vitamin E wirkt als unpolares Agens vor allem im lipophilen Kompartiment, also im LDL. Auf die Superoxidbildung hat es somit im Gegensatz zu den hydrophilen Substanzen wie z.B. Vitamin C keinen Einfluß [198-199].

N-Acetylcystein hatte ebenfalls signifikante Effekte auf die Hemmung der Monozytenadhäsion in 20 mmolarer Konzentration. Dies entspricht Beobachtungen, die auch Chiu et al. [200] bei verschiedenen Arten von Zellstimulierungen (TNF α , PMA, shear-stress) gemacht haben.

Als Vermittler der oxidativen Veränderungen kommt dem Superoxidradikal eine zentrale Rolle zu [197]. Das Superoxidradikal tritt physiologisch in mehreren Stoffwechselwegen in geringer Konzentration auf und wird sehr schnell enzymatisch durch die SOD zu Wasserstoffperoxid und der Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut.

Unter pathophysiologischen Bedingungen entsteht jedoch soviel Superoxid, daß es nicht mehr effizient eliminiert werden kann. Es kommt zu intrazellulären oxidativen Veränderungen und zum Anstieg der Expression von Adhäsionsmolekülen [201]. Mit der Zunahme der Expression der Adhäsionsmoleküle nehmen auch die Wechselwirkungen der Endothelzellen mit den Monozyten zu und damit die Zahl der adhärierenden Monozyten.

Es lag nahe zu vermuten, daß die „physiologischen Superoxidfänger“ Superoxiddismutase und die Katalase auch in vitro die Adhäsion von Monozyten hemmen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden, wahrscheinlich weil die Proteine nicht in der Lage sind, wie das Tiron die Membranbarriere zu überwinden [202]. Sie können so nur extrazelluläres Superoxid abfangen; die intrazellulären reaktiven Sauerstoffverbindungen werden nicht abgefangen und damit wird auch die Expression der Adhäsionsmoleküle nicht beeinflusst.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung des Auftretens von Superoxidradikalen ist die Hemmung der enzymatischen Bildung.

Als wesentliche Quelle von intrazellulärem Superoxid wird häufig die Xanthinoxidase (XOD) erwähnt, auch wenn eine zentrale Rolle dieses Enzyms nicht bewiesen werden konnte [203]. Die Xanthinoxidase wird durch das Xanthinderivat Allopurinol und dessen Metabolit Oxypurinol kompetitiv gehemmt. Eine Inkubation der mit LDL stimulierten Endothelzellen mit Allopurinol zeigte eine signifikante Reduktion der im Anschluß adhärierenden Monozyten. Ähnliches bestätigt die Studie von Granger et al. [204], bei der gezeigt wurde, daß durch einer Allopurinolbehandlung die Leukozytenadhärenz nach Ischämie/ Reperfusion vermindert wurde.

5.4 Effekte von Salicylsäurederivaten auf die Monozytenadhäsion und die VCAM-I-Expression

Salicylate hemmten sowohl die durch 200 U/mL TNF- α als auch die durch 30 mg/dL oxLDL bzw. 300 mg/dL nLDL gesteigerte Adhäsion der Monozyten am Endothel. Diese Hemmung der Adhäsion war in allen Adhäsionsversuchen konzentrationsabhängig im Bereich von 0,01 bis 1 mM. Die tendenziell stärksten Effekte wurden durch das NO \cdot -Derivat der Acetylsalicylsäure bewirkt. Salicylsäure hatte im Vergleich mit ASS und NCX-4016 die schwächste Wirkung. Der Einfluß von ASS auf die durch 300 mg/dL nLDL hervorgerufene Monozytenadhäsion ist in der Konzentration von 1 mM vergleichbar mit der Wirkung der Antioxidantien Vitamin C und E in 100 μ molarer Konzentration. Ähnliche Effekte zeigte NCX-4016 bereits in 0,5 mmolarer Konzentration.

Die hemmenden Effekte von Acetylsalicylsäure und auch von NCX-4016 auf die Monozytenadhäsion ließen sich durch einen starken Überschuß an Xanthin und Xanthinoxidase wieder aufheben. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die durch nLDL gesteigerten oxidativen Veränderungen zwar durch Salicylate hemmbar sind, nicht aber die Veränderungen, die durch externe Superoxidradikale entstehen.

Die durch 150 mg/dL nLDL stimulierte Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-I wurde konzentrationsabhängig durch Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und NCX-4016 gehemmt. Durch Zugabe von exogenem Superoxid durch die Xanthin-Xanthinoxidase-Reaktion wurde die VCAM-1-Expression wieder gesteigert.

Dadurch, daß die durch TNF- α bzw. durch oxLDL bzw. nLDL gesteigerte Zahl der adhärierenden Monozyten durch Ibuprofen nicht beeinflußt werden konnte, kann man

schließen, daß die Aktivierung der Endothelzellen bzw. die Hemmung durch Salicylate nicht über die Hemmung der Cyclooxygenase zustande kommt. Ähnliches gilt auch für die VCAM-1-Expression.

Auch Pierce et al. [205], Gerli et al. [206] und Zünd et al. [207] machten die Beobachtung, daß Salicylate hemmenden Einfluß auf die Monozytenadhäsion bzw. die Expression von Adhäsionsmoleküle haben. Von Weber et al. [208] wurde der hemmende Effekt auf TNF- α -stimulierte Endothelzellen gezeigt, ebenfalls wie in hier vorliegender Studie mit einem COX-Hemmer als Referenzsubstanz (Indometacin). Auch von dieser Arbeitsgruppe wurde gefolgert, daß ein nicht-COX-abhängiger Mechanismus für die Beobachtungen verantwortlich gemacht werden muß.

Diese Beobachtungen lassen sich u.a. damit erklären, daß ASS antioxidativ über das Abfangen vom Hydroxylradikal wirkt [160]. Ähnliches dürfte auch für Salicylsäure gelten. Zum Tragen kommt möglicherweise auch, daß die Verbindungen chelatisierende Effekte haben, also freie Eisen-Ionen abfangen können, wie Wang [209] für ASS beschrieb. ASS wirkt ferner auch indirekt als Eisen-Fänger durch Steigerung der Ferritin-Synthese [157].

Von Relevanz ist ferner die hemmenden Eigenschaften der Salicylate auf die Aktivität der I κ B-Kinase- β , wie sie von Yin et al. [153] gezeigt wurde. Durch die Hemmung dieser Kinase findet die Phosphorylierung des I κ B nicht statt. I κ B dient als „Kittsubstanz“ zwischen den beiden NF- κ B-Untereinheiten im Cytoplasma. Damit NF- κ B aber seine Funktion erfüllen kann, muß es in die beiden Untereinheiten gespalten werden. Nur so kann es in den Zellkern wandern und die Transkription auslösen, die unter anderem zur Expression von Adhäsionsmolekülen führt.

Die bekannteste Reaktion der Salicylate ist die Hemmung der Cyclooxygenase (COX 1 und 2). Die Cyclooxygenase katalysiert die Cycloperoxidation der Arachidonsäure zu dem Prostaglandin E₂ und dem Prostaglandin H₂. Ferner setzt die COX auch Superoxidradikale frei [210]. Die Hemmung der COX erfolgt auch durch Ibuprofen. Jedoch zeigte Ibuprofen keine signifikante Hemmung der Adhäsion, so daß man folgern kann, daß die Rolle der COX bei der Adhäsion –wenn überhaupt- eher von geringerem Maße ist.

Einen weiteren interessanten Denkansatz wies die Studie von Hermann et al. [158] auf. Sie beobachteten, daß Salicylate die Oxidation des LDL dadurch inhibieren, daß sie das Produkt aus Superoxid und Stickstoffmonoxid, das Peroxynitrit sowie Folgeprodukte unter Bildung von hydroxylierten und nitrierten Aromaten abfangen. Peroxynitrit ist ferner ebenfalls ein Aktivator des Transkriptionsfaktors NF- κ B, so daß auch hier ein protektiver Effekt der Salicylate durch das Abfangen dieses Produkts vorliegt.

5.5 Einfluß von NCX-4016 und Acetylsalicylsäure auf die Bildung des Peroxidationsprodukts 8-iso-PGF_{2α}

Die durch 300 mg/dL nLDL vermittelte Stimulation der Endothelzellen bewirkte einen deutlichen Anstieg des 8-iso-Prostaglandins F_{2α}. Das 8-iso-PGF_{2α} wird Cyclooxygenase-unabhängig durch freie Radikale katalysierte Lipidperoxidation von Arachidonsäure über ein von Samuelsson [211] beschriebenes bicyclisches Endoperoxid gebildet. Isoprostane sind ein Indikator für vermehrtes intrazelluläres Vorkommen von reaktiven Sauerstoffverbindungen und damit verbundenen oxidativen Streß [212].

Durch die gleichzeitige Inkubation der Endothelzellen mit nLDL und den Salicylaten Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und NCX-4016 wurde die Bildung des 8-iso-PGF_{2α} reduziert. Ebenfalls wurde die 6-Keto-PGF_{1α}-Bildung durch diese Substanzen, aber auch durch Ibuprofen vermindert. PGF_{1α} wird Cyclooxygenase-abhängig aus Arachidonsäure gebildet. Die Reduktion der Bildung kann somit als Indikator für die Hemmung der Cyclooxygenase angesehen werden.

Die 6-Keto-PGF_{1α} -Bildung wurde durch die Salicylate wie auch durch das Propionsäure-Derivat konzentrationsabhängig vermindert.

Die Bildung von 8-iso-PGF_{2α} wurde dagegen nur durch die Salicylate, nicht aber durch Ibuprofen beeinflusst.

Diese Beobachtung zeigt, daß a) die 8-iso-PGF_{2α} -Bildung nicht durch Hemmung der COX beeinflusst wird b) der intrazelluläre oxidative Streß durch LDL zunimmt und c) die Salicylate den oxidativen Streß mindern.

5.6 Molekulare Mechanismen, die dem antioxidativen Effekt von Acetylsalicylsäure und NCX-4016 zugrunde liegen könnten

Wie die oben aufgeführten Beobachtungen ergaben, hemmten Acetylsalicylsäure und NCX-4016 die Adhäsion von Monozyten an stimulierten Endothelzellen über einen antioxidativen Mechanismus. Neben der cyclooxygenasehemmenden Wirkung besitzen beide Substanzen auch einen hemmenden Effekt auf die NF-κB-Aktivierung, einem Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf oxidativem Streß gebildet wird [130]. Diese Wirkung war schon längere Zeit bekannt [151] und mittlerweile wurde sogar der Mechanismus dieser Hemmung beschrieben [153]. Durch die Hemmung der Aktivität der

I κ B-Kinase- β findet die Phosphorylierung des I κ B nicht statt. Dadurch unterbleibt die Aktivierung des NF- κ B.

Iademarco et al. [213] und auch Neish et al. [214] stellten fest, daß zur Expression von VCAM-1, worüber letztendlich die Adhäsion vermittelt wird, die Aktivierung von NF- κ B nötig ist.

Die vorliegende Studie bestätigt die hemmende Wirkung auf NF- κ B durch Salicylsäure und Acetylsalicylsäure und zeigt zudem, daß das NO[•]-Derivat der Acetylsalicylsäure NCX-4016 das NF- κ B noch stärker hemmt als ASS. Auch von Peng et al. [215] und De Caterina et al. [216] wurde beobachtet, daß Stickstoffmonoxid die Expression des NF- κ B reduziert.

Desweiteren wurde gezeigt, daß Antioxidantien wie das Pyrrolidindithiocarbamat das NF- κ B inhibieren. Dies schilderten auch Erl et al [217] für Vitamin E, Weber et al. [185] für PDTC und NAC und Bowie et al. [124] für Vitamin C. Diese Wirkung der Antioxidantien erklärt auch zum Teil die Effekte auf die Monozytenadhäsion, die mit der Hemmung der Oxidierung von LDL allein nicht interpretierbar wären.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Beeinflussung des intrazellulären Eisengehalts durch ASS bzw. NCX-4016. Die Rolle von intrazellulären freien Eisenionen beziehungsweise Ionen der ersten Übergangsreihe beim oxidativen Stress ist ungeklärt. 1988 führten Halliwell et al. [218] die prooxidativen Wirkung des Eisens darauf zurück, daß Eisen a) die Haber-Weiss-Reaktion von Superoxid und Wasserstoffperoxid zu Hydroxylion, Sauerstoff und dem extrem reaktiven Hydroxylradikal, welches Lipide angreifen und den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren kann, und b) die Reaktion von Lipidperoxiden und Lipidperoxyradikalen katalysiert.

Das Vorhandensein von größeren Mengen von freien Eisenionen, die für eine Fenton-Reaktion oder einer Haber-Weiss-Reaktion ausreichen würde, ist intrazellulär unwahrscheinlich.

Diese Studie konnte jedoch zeigen, daß Deferoxamin, eine Substanz, die Eisen komplex bindet, sehr wohl eine Wirkung auf die Zahl der an das stimulierte Endothel adhärierenden Monozyten hat.

Wie schon angeführt, haben beide Substanzen nach Metabolisierung zu Salicylsäure selbst komplexierende Eigenschaften und können Metallionen wie z.B. das Eisenion abfangen, so daß diese nicht mehr für Metallionen-katalysierte oxidative Reaktionen zur Verfügung stehen. Aufgrund früherer Beobachtungen der antioxidativen Eigenschaften [219, 220] untersuchten Oberle et al. [157] den Einfluß auf die Ferritinsynthese. Ferritin ist ein intrazelluläres Protein,

das die freie Eisenkonzentration reguliert. Eine erhöhte Ferritinkonzentration ist gleichzusetzen mit einer Erniedrigung des Risikos des oxidativen Stresses.

Eine 10 µmolare ASS-Konzentration bewirkte in dieser Studie einen signifikanten Anstieg der Ferritinsynthese um das 1,5-fache, die selbst in 1 mmolarer Konzentration nicht wesentlich übertroffen wurde. Oberle et al. [157] konnten dagegen eine sehr deutliche Konzentrationsabhängigkeit beobachten: einen Anstieg der Ferritinsynthese um das 2,5-fache (0.03 mmol/L ASS), 3,7-fache (0.1 mmol/L ASS), und 4,0-fache (0.3 mmol/L ASS) gegenüber der Kontrolle. Auch sie konnten wie in der vorliegenden Studie keine Ferritin-induzierenden Effekte durch Salicyläure nachweisen.

NCX-4016 bewirkte keinen Anstieg der Ferritinsynthese. Möglicherweise antagonisiert das freigesetzte Stickstoffmonoxid die Wirkung der nach Esterspaltung noch verbleibenden Acetylsalicylsäure. Für diese Annahme sprechen auch die Ergebnisse der Studie von Pantopoulus und Hentze [221] an Fibroblasten. Sie postulierten eine Reaktion von Stickstoffmonoxid mit dem FeS-Cluster des IRP (iron regulating protein, IRE-BP, iron regulating binding protein), so daß das IRP an das IRE (iron responsive elements) der Ferritin-mRNS bindet, wodurch posttranskriptionell eine Ferritinfreisetzung unterdrückt wird. Ähnliches formulierten auch Richardson et al. [64].

Das Abfangen von Eisenionen durch gesteigerte Ferritinbildung kann also nicht die antioxidative und adhäsionshemmende Wirkung des NCX-4016 erklären.

5.7 Einfluß von Stickstoffmonoxid bei der Adhäsion von Monozyten am stimulierten Endothel

Der Adhäsionsversuch mit ISDN, GTN und NCX-4016 zeigt, daß NO[•]-Donatoren die Adhäsion von Monozyten am durch 300 mg/dL nLDL stimulierten Endothel hemmen. Die Beobachtung, daß Substanzen, die Stickstoffmonoxid freisetzen, die Monozytenadhäsion hemmen, machten auch schon De Caterina et al. [216].

Die Adhäsion wurde sowohl durch ISDN als auch durch GTN und NCX-4016 konzentrationsabhängig gehemmt, wobei die Hemmung durch ISDN vergleichbar mit der von NCX-4016 ist. Glycerintrinitrat zeigte signifikante Effekte auf die Adhäsion bereits in niedrigeren Konzentrationen, während in höheren Konzentrationen (ab 0,5 mM) die Adhäsion tendenziell wieder etwas zunimmt. Auch andere Arbeitsgruppen berichteten, daß Stickstoffmonoxid durchaus in der Lage ist, auch die Monozytenadhäsion zu steigern, z.B.

nach Oxidation des LDL [222]. Aus diesem Grund wurde das durch die Zellen aus den NO[•]-Donatoren freigesetzte Nitrit bestimmt. Glycerintrinitrat setzte wie erwartet in etwa die dreifache Menge Nitrit pro Mol Wirkstoff frei wie das NCX-4016. Aus ISDN wurde ungefähr genauso viel Nitrit gebildet wie aus dem Salicylsäurederivat, obwohl aus ISDN potentiell doppelt soviel Nitrit entstehen könnte wie aus dem NCX-4016. Auch Strein et al. [223] beobachteten, daß ISDN sehr schnell ein Mol Nitrit pro Mol Substanz freisetzt, während die NO[•]-Abspaltung von Isosorbidmononitrat zu Isosorbid sehr langsam abläuft.

Exogenes Stickstoffmonoxid wirkt offensichtlich je nach Donator oder Menge des freigesetzten NO[•] antiatherogen oder proatherogen.

Diese Beobachtung ließe sich damit erklären, daß Stickstoffmonoxid in hohen Mengen mit großen Mengen an Superoxid zu viel proatherogenem Peroxynitrit umgesetzt wird. Dieses nitriert aromatische Aminosäuren, die dadurch im Proteinverband ihre Eigenschaften verändern und möglicherweise die Aktivierung von NF-κB hervorruft.

Durch die Hemmung der NO[•]-Synthase mit dem L-Argininanalogon ADMA (100 μM) wurde die Monozytenadhäsion gegenüber dem unstimulierten Ansatz signifikant gesteigert. Diese Steigerung ließ sich durch eine Inkubation der Zellen mit L-Arginin (1 mM) wieder verringern. Dies zeigt, daß sowohl endogenes als auch exogenes Stickstoffmonoxid die Adhäsion von Monozyten beeinflusst.

Chan et al. [224] und Böger et al. [225] stellten ebenfalls fest, daß ADMA die Monozytenadhäsion steigert und daß dieser Effekt zum Teil reversibel durch L-Arginin ist.

Möglicherweise trägt das LDL durch Hemmung der endogenen Stickstoffmonoxidbildung durch Hemmung der NOS zu dem NO[•]-Defizit bei [71].

Stickstoffmonoxid hemmt ferner die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf-κB. Peng et al. [215] fanden heraus, daß Stickstoffmonoxid die inhibitorische Untereinheit von NF-κB stabilisiert, so daß keine Proteolyse des IκB-α erfolgt, wahrscheinlich über eine S-Nitrosylation des C62-Rests der p50-Untereinheit [226]. Diese ist jedoch notwendig, damit das Heterodimer freigesetzt werden kann und in den Zellkern wandern kann.

Auf diese Weise unterbleibt die Aktivierung von NF-κB und damit die Transkription von VCAM-1.

5.8 Bedeutung der Ergebnisse für die Pathophysiologie und Therapie atherosklerotischer Gefäßerkrankungen - Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse der in-vitro-Untersuchungen geben mögliche Hinweise auf verwandte Reaktionen in vivo, wie sie bei der Entwicklung der Atherosklerose auftreten. Ursache der Atherosklerose ist einerseits die Dysfunktion des Endothels und die Intimaverdickung andererseits.

Die Dysfunktion des Endothels entsteht durch Verminderung der endothelialen NO[•]-Produktion durch die NO[•]-Synthase und bzw. oder durch verringerte Bioverfügbarkeit des NO[•] durch die oxidative Inaktivierung des Stickstoffmonoxids. Dies bedeutet für das Gefäß, daß die Relaxation gemindert wird.

Das Gleichgewicht zwischen Stickstoffmonoxid und Bildung der Sauerstoffradikale verschiebt sich immer mehr in Richtung der Sauerstoffverbindungen, die ihrerseits über NF-κB die Monozytenadhäsion noch vorantreibt.

Die Intimaverdickung ist Folge der Hypercholesterinämie. Die Zelle benötigt Cholesterin und nimmt es in geringen Mengen aus dem zirkulierenden Cholesterinpartikeln (HDL / LDL) auf. Bei einem Überschuß an LDL kommt es zu einer Überladung der Zellen und Veränderung des LDL zu zumeist oxidiertem LDL (neben glykosyliertem LDL). Dieses veränderte LDL wird von Makrophagen phagozytiert und es bilden sich sogenannte Schaumzellen in der Intima. Das Gefäßlumen verengt sich zusehends, die Entzündungsreaktion wird vorangetrieben und die Produktion von Sauerstoffradikalen wird gesteigert. Irgendwann produziert die Zelle nicht mehr ausreichend Stickstoffmonoxid, um bei Bedarf durch eine Relaxation die Durchblutung zu gewährleisten.

Ein Wirkstoff, der sowohl antientzündlich wirkt, Stickstoffmonoxid freisetzt und gewisse antioxidative Potenz als Gegenspieler für den Überschuß an Superoxid hat, scheint daher deutliche Vorteile zu haben.

Wenn man davon ausgehen kann, daß sich die in-vitro-Ergebnisse auch klinisch bestätigen lassen, und Hemmung der Adhäsion sich mit Hemmung oder Milderung der Atherosklerose gleichsetzen läßt, dürfte diese Studie die Ansicht unterstützen, daß Antioxidantien prophylaktisch wirksam sind. Um dies noch genauer herauszufinden und am Patienten abzusichern bedarf es jedoch weiterer Studien.

6 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Studie zeigt den Einfluß von Salicylaten auf die Adhäsion von Monozyten an stimulierten Endothelzellen und führt molekulare Mechanismen an, die dieser Beobachtung zugrunde liegen könnten.

Es wurde festgestellt, daß die Adhäsion von Monozyten am Endothel durch Stimulation mit nativem als auch verändertem (oxidiertem) LDL in vitro gesteigert wurde.

Eine zentrale Rolle bei der Stimulation der Endothelzellen nimmt dabei der Anstieg von reaktiven Sauerstoffverbindungen ein. Durch gleichzeitige Inkubation der Endothelzellen mit Radikalfänger bzw. Antioxidantien wurde die Zahl adhärerender Monozyten signifikant reduziert.

Die Salicylate Salicylsäure, Acetylsalicylsäure und NCX-4016 hemmten in höheren Konzentrationen (0,5 mM) die Adhäsion der Monozyten ungefähr so stark wie die Antioxidantien. Die Hemmung der Adhäsion erfolgte über die Reduktion der Expression des Zelladhäsionsmoleküls VCAM-I. Die Expression dieses Adhäsionsmoleküls ist redoxabhängig und wird dementsprechend in Gegenwart von radikalischen Sauerstoffverbindungen, wie sie beim oxidativen Streß auftreten, verstärkt exprimiert. Die durch Koinkubation der Endothelzellen mit LDL und Salicylate verringerte Bildung von 8-iso-PGF_{2α} bestätigt die These, daß sie die Adhäsion von Monozyten über einen antioxidativen Mechanismus hemmen. Die Bildung des 8-iso-PGF_{2α} findet Cyclooxygenase-unabhängig statt, wie die Inkubation der Zelle mit Ibuprofen zeigte, bei der keine Verringerung der 8-iso-PGF_{2α}-Freisetzung auftrat.

Durch Ibuprofen wurde die Adhäsion von Monozyten nicht gehemmt, ebenfalls wurde wie gesagt die 8-iso-PGF_{2α}-Bildung nicht beeinflusst. Dies untermauert die Annahme, daß der Hemmung der Adhäsion eine antioxidative Wirkung zugrunde liegt.

Die NF-κB-Bildung wurde durch die Salicylate NCX-4016 und ASS signifikant vermindert, während hier Ibuprofen ebenfalls keine Effekte zeigte.

Durch Acetylsalicylsäure wurde ferner die Ferritinsynthese gesteigert. Ferritin wirkt intrazellulär dadurch antioxidativ, daß es Eisenionen bindet und diese dadurch nicht mehr für katalytische Reaktionen zur Verfügung stehen. Diese Eigenschaft der Salicylate erklärt wohl zum Teil die Wirkung auf die Monozytenadhäsion, konnte aber die doch starken Effekte des NO[•]-Derivats der Acetylsalicylsäure nicht begründen. Die Adhäsionsversuche zeigten aber auch den hemmenden Effekt, den die NO[•]-Donatoren auf die Adhäsion hatten. Es konnte

zudem demonstriert werden, daß durch die Hemmung der endogenen NO[•]-Synthase die Adhäsion von Monozyten an mit ADMA inkubierte Endothelzellen zunimmt, welche durch L-Arginin zum Teil reversibel war. Es ist noch nicht ganz klar, über welchen Mechanismus NO[•]-Donatoren die Monozytenadhäsion hemmen bzw. antioxidativ wirken.

7 Anhang

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien/ Biochemikalien

Alle Chemikalien waren von pro analysi-Reinheit beziehungsweise entsprachen den Vorschriften der gültigen Arzneibücher.

Chemische Substanz	Hersteller	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbol symbol
Aceton	Baker, Deventer, Holland	11-36-66- 67	9-16-26	F, Xi
Acetonitril	Merck, Darmstadt, Deutschland	11-3/24/25	16-27-45	F, T
2-Acetoxybenzoat-2-[2- nitroxy-methyl]-phenylester, NCX-4016	Nicox, Sophia- Antipolis, Frankreich	nicht definiert	nicht definiert	nicht definiert
Acetylsalicylsäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	22		Xn
Aktivkohle Norit A	Serva, Heidelberg, Deutschland			
Allopurinol	Caesar & Loretz, Hilden, Deutschland	25-43	45-28- 36/37/39	
Ameisensäure 98-100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland	35	23.2-26- 45	C
Ampuwa ® für Spülzwecke	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland			
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland			

Aspisol ®	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland			
2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiaolinsulfonsäure) (ABTS)	Boehringer, Mannheim, Deutschland	41-37/38	26-36-22	
N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA)	Pierce, Rockford, U.S.A.			
Bovines Serum Albumin	Serva, Heidelberg, Deutschland			
Butylhydroxytoluol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland	36	22-24	Xi
Cholesterol 20, Cholesterol-Kit	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
Cholesterol-Kalibrator 200 mg/dl	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
Cyclohexan, Uvasol	Merck, Darmstadt, Deutschland	11-38-50/53-65-67	9-16-33-60-61-62	F, Xn, N
Deferoxaminmesylat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
Dextran T70	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland			
N,N-Diisopropyl-ethylamin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	11-34-20/21/22	16-26-36/37/39-23	F, C
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	36/37/38	26-36-23	Xi

N ^G ,N ^G -Dimethylarginin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Fluka, Deutschland	22- 36/37/38	26-36	Xn
EDTA-Titriplex III	Merck, Darmstadt, Deutschland	22		Xn
EGTA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
Ethanol, absolut	Baker, Deventer, Holland			F
Ethylacetat Suprasolv	Merck, Darmstadt, Deutschland	11-36-66- 67	16-26-33	F, Xi
Folin- und Ciocalteu's Phenolreagenz	Sigma, Deisenhofen Deutschland	34- 20/21/22- 40	26-23- 36/37/39	
Gelatine	Serva, Heidelberg, Deutschland			
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland			
Glutaraldehyd	Aldrich, Steinheim, Deutschland	22-23-34- 42/43-50	26- 36/37/39- 45-61	T, N
HEPES, 1 molare Lösung (N- [2-Hydroxyethyl]pi- perazin-N'-[4-butansulfon- säure])	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
n-Heptan	Baker, Deventer, Holland	11-38- 50/53-65- 67	9-16-29- 33-60- 61-62	F, Xn, N
Ibuprofen	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	22-63	36-22	

Igepal CA-630 ((Octylphenoxy)polyethoxy- Ethanol)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	22-41	26-36-23	Xi
Isoket Lösung 0,1% pro infus.	Schwarz Pharma, Monheim, Deutschland			
Kaliumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland			
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland			
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland	22-35	26- 36/37/39- 45	C
Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat	Sigma, St. Louis, U.S.A.			
Katalase	Sigma, St. Louis, U.S.A.			
6-Ketoprostaglandin F _{1α}	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
Kochsalzlösung, isoton.	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland			
Kupfersulfat-Pentahydrat	Aldrich, Steinheim, Deutschland	22-36/38- 50/53	22-60-61	Xn, N
Magnesiumchlorid- Heptahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland			
Methanol	Baker, Deventer, Holland	11- 23/24/25- 39/2324/25	7-16- 36/37-45	F, T
N-(1-Naphthyl)- ethylendiamin- dihydrochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland	36/38	22	Xi

Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland	36	22-26	Xi
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland			
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland			
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland			
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland	35	26-37/39-45	C
Natriumkaliumtartrat-tetrahydrat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
Natriumnitrit	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland	8-25-50	45-61	O, T, N
Nitrolingual infus.	Pohl Boskamp, Hophenlockstedt, Deutschland			
2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid	Aldrich, Steinheim, Deutschland	34	26-36/37/39-27-23	Xi
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	26/27/28-34-15	45-36/37/39-22	
Phorbol-12,13-dibutyrat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	26/27/28-36/37/38	45-26-27-36/37/39	
Phosphorsäure 85 %	Merck, Darmstadt, Deutschland	34	26-36/37/39-45	C
8-iso-15(R) Prostaglandin F _{2α}	Cayman Chemical, Ann Arbor, U.S.A.			
(3H)-6-KetoprostaglandinF _{1α}	DuPont, BadHomburg, Deutschland			

6-Keto-prostaglandinF _{1α} -Antikörper	Sigma Immuno Chemicals, Deisenhofen, Deutschland			
[3, 3', 4, 4' - ² H ₄]-8-iso-PGF _{2α}	Cayman Chemical, Ann Arbor, U.S.A.			
Pyrrolidintithiocarbamat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	36/37/38	26-36	
Salicylsäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	22-37/38-41	26-39	Xn
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	34-37	26-36/37/39-45	C
Schwefelsäure, konz.	Merck, Darmstadt, Deutschland	35	26-30-45	C
Sulfanilsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland	36/38-43	24-37	Xi
Superoxiddismutase	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			
Tiron	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	36/37/38	26-36	
Tocopherolphosphat-Dinatriumsalz	Sigma, Deisenhofen Deutschland			
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	40	22-36/37	Xn
Tris(hydroxymethyl)amino-Methanhydrochlorid (TRIS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland	36/37/38	26-36	Xi
Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland			

Xanthin	Calbiochem- Novabiochem, La Jolla, Kanada			
Xanthinoxidase	Calbiochem- Novabiochem, La Jolla, Kanada			

Reagenzien für die Zellkultur bzw. für die Zellkulturversuche

monoklonaler Antikörper gegen CD 106	Immunotech, Marseille, Frankreich
Biotinylierter sekundärer Antikörper gegen Immunglobulin G der Maus	Amersham, Buckinghamshire, UK
L-Arginin (100x) für MEM	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Di-Natriumcystin (100x) für MEM	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Dulbeccos PBS	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Fetales Kälberserum	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Glukose (100x) für MEM	GibcoBRL, Paisley, Scotland
L-Glutamin (100x) für MEM	GibcoBRL, Paisley, Scotland
HBSS, Hanks´ balanced salts w/o Calcium and Magnesium	GibcoBRL, Paisley, Scotland
HBSS, Hanks´ balanced salts solution	GibcoBRL, Paisley, Scotland
i-Inositol (100x) für MEM	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Hepes (10x)	GibcoBRL, Paisley, Scotland
CO ₂ -Gas	Linde, Hannover
L-Leucin (100x) für MEM	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Medium 199 Earles mod. salts	GibcoBRL, Paisley, Scotland
L-Methionin (100x) für MEM	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Minimum Essential Medium (MEM)	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Natriumchlorid (100x) für MEM	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Penicillin-Streptomycin-Lösung 10.000 IE Penicillin/ml, 10.000 µg Streptomycin/ml	GibcoBRL, Paisley Scotland
RPMI 1640 Zellkulturmedium mit L-Glutamin	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Stickstoff	Linde, Hannover
Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat-Reagenz	Amersham, Buckinghamshire, UK
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	GibcoBRL, Paisley, Scotland

Für die GC-MS verwendete Gase:

Helium (5,0), Methan (5,5) und Argon (5,0)	Linde, Hannover
--	-----------------

7.1.2 Reagenz-Lösungen

Griess-Reagenz A

37,5 mM Sulfanilsäure in dest. Wasser.

Griess-Reagenz B

12,5 mM N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-dihydrochlorid in dest. Wasser.

Lowry-Reagenzien

Lösung A

1,0 g Kupfersulfat in 100 ml dest. Wasser

Lösung B

2,0 g Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat in 100 ml dest. Wasser

Lösung C

2,0 g Natriumcarbonat in 0,1 N NaOH

Lowry-Reagenz-Mischung

Mischung aus 50 ml Lösung C, 0,5 ml Lösung B und 0,5 ml Lösung A

Folins-Reagenz

Mischung aus 2,5 ml 2N Folin und 2,5 ml dest. Wasser

RIA-Kohle

Eine Lösung von 1 % Aktivkohle Norit A und 1 % Dextran T70 in RIA-Puffer wird 30 min bei 4°C gerührt, anschließend 10 min bei 1200 g zentrifugiert. Das Pellet wird in RIA-Puffer aufgenommen und zweimal gewaschen

7.1.3 Pufferlösungen

Die pH-Werteinstellung erfolgte mit Salzsäure beziehungsweise Natriumhydroxidlösung. Zur Herstellung wurde - sofern nicht anders aufgeführt - destilliertes Wasser verwendet.

Puffer A (Waschpuffer zur Entfernung des Zellkulturmediums und als Medium für die Isoprostanversuche und die Nitritfreisetzungsversuche)

Natriumchlorid

8,00 g

Kaliumchlorid	0,20	g
Di-Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	1,15	g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,20	g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,10	g
Glukose-Monohydrat	1,10	g
Calciumchlorid-Dihydrat	0,10	g
Aqua dest. ad	1000,0	g
pH 7,4		

Puffer B (HBSS-EDTA zum Waschen der Monozyten und Zellzählung)

5 mM EDTA in HBSS, pH 7,4

Puffer C (Bindungspuffer für Adhäsionsversuche)

2mM Calciumchlorid, 2mM Magnesiumchlorid, 10 mM Hepes in HBSS, pH 7,4

Puffer D (Phosphatpuffer für ELISA)

6,5 mM di-Natriummonohydrogenphosphat, 2,5 mM Natriumdihydrogenphosphat, in isotonischer Kochsalzlösung, pH 7,4

Puffer E (ABTS-Puffer für ELISA)

0,1 M Natriumacetat, 0,05 M Natriumdihydrogenphosphat, 0,2 mM ABTS, pH 4,2

Puffer F (RIA-Puffer)

1,62 % (V/V) 0,5 M di-Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat, 0,38 % (V/V) 0,5 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 10 % (V/V) 9 %-ige Natriumchlorid-Lösung und 88 % (V/V) doppelt destilliertes Wasser, pH 7,4

Puffer G (BSA-RIA-Puffer)

1%-ige Lösung von Bovinem Serum Albumin (Serva) in RIA-Puffer

Puffer H (Kernextraktionspuffer I für Gel-Shift-Assay)

10 mM HEPES, 10 mM Kaliumchlorid, 100 µM EDTA, 100 µM EGTA, 1mM DTT, 500 µM PMSF, pH 7,9

Puffer I (Kernextraktionspuffer II für Gel-Shift-Assay)

20 mM HEPES, 400 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7,9

7.1.4 Geräte

Analysator für den Mikropartikel-Enzymimmunoassay

Abbott IMX System

Abbott, Wiesbaden, Deutschland

Analysegerät zur Bestimmung von Triglyceriden auf der Grundlage eine spektroskopischen Messung nach Enzymreaktion

Abbott Vision

Abbott, Wiesbaden, Deutschland

DC-Applikator

TLC-Applikator AS 30

Desaga, Heidelberg, Deutschland

DC-Entwicklungskammer

DC-MAT 230 V

Desaga, Heidelberg, Deutschland

ELISA-Reader

Dynatech MR 5000

Dynatech Laboratories, Denkendorf,
Deutschland

Drucker:

PanasonicQuiet KX-P2123

Matsushita, Osaka, Japan

Mikroskop

Olympus CK 2, 601669

Olympus Optical, Hamburg,
Deutschland

Olympus

Olympus Optical, Hamburg,
Deutschland

Photometer

Ultrospec II UV/Visible Spektrometer

LKB Biochrom, Freiburg, Deutschland

Szintillationszähler

LKB Wallac, Rackbeta, 1211

Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden

Zentrifugen

Beckmann L8-70

Beckmann Instruments, München,
Deutschland

Biofuge 15	Heraeus Sepatech, Deutschland
Kühlzentrifuge RC5C	Sorvall Instruments DuPont, Bad Homburg, Deutschland
Kühlzentrifuge K2S	Hettich Universal, Tuttlingen, Deutschland
Labofuge	
Zentrifuge CR 412	Jouan, Deutschland

7.1.5 Weitere Materialien

Autosampler, Microeinsätze, Spitzvials	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehn, Deutschland
Bluecap 50ml, 15 ml	Greiner, Fichtenhausen, Deutschland
DC-Fertigplatten SIL G-25	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Dialysekassetten, Slide-A-Lyzer 10.000MWCO	Pierce, Rockford, U.S.A
Küvetten(10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Deutschland
Magnetrührer, HI 190 M	Hanna Instruments, Deutschland
Pasteurpipetten	Eppendorf, Deutschland
Polypropylenröhrchen, 10 ml, 4 ml	Greiner, Fichtenhausen, Deutschland
Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke)	Jürgens, Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	Millipore, Molsheim, Frankreich
Thermoblock, Bioblock Scientific Code 92675	Thermolyne Corp., U.S.A.
Thermostat 5320	Eppendorf, Deutschland
Ultrazentrifugenflaschen, PP 30 ml	Sorvall, DuPont, Newton, U.S.A.
Varipetten 10,100,1000 µl	Eppendorf, Deutschland
Vortexer, Reax 200	Heidolph, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Corning, New York, U.S.A.
Zellkultur-6-Lochplatten	Corning, New York, U.S.A.
Zellkultur-96-Lochplatten	Nunc, Roskilde, Dänemark

7.2 Literatur

[1] Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376

[2] Lüscher T.F., Vanhoutte P.M. The Endothelium: Modulator of Cardiovascular Function. Boca Raton: *CRC Press*. 1990

-
- [3] Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109-142
- [4] Shimokawa H., Vanhouette P.M. Endothelium and vascular injury in hypertension and atherosclerosis. In: Zanchetti A., Marcia G (eds): Handbook of hypertension *New York Elsevier Science* 1997; 1007-1065
- [5] Vanhouette P.M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur. Heart J.* 1997; 18 (Suppl Ed E19-E29)
- [6] Wick G., Schett G., Amberger A., Kleindienst R., Xu Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol. today* 1995; 16, 27-33
- [7] Mutin M., Dignat-George F., Sampol J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue Antigens* 1997; 50: 449-458
- [8] Furchgott R.F. The role of endothelium in the presence of vasculare smooth muscle drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1984; 24: 175-197
- [9] Furchgott, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activalable inhibitory factor from retractor penis is organic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide In: Vanhouette P.M. (Eds.): Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides and endothelium *Raven Press, New York* 1988, 401-418
- [10] Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526
- [11] Ignarro L.J., Byrns R.E., Buga G.M., Wood K.S. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 9265-9269

-
- [12] Feelisch M., te Poel M., Zamora R., Deussen A., Moncada S. Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature* 1994; 368: 62-65
- [13] Iyengar R., Stuehr D.J., Marletta M.A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987 84: 6369-6373.
- [14] Palmer R.M.J., Ashton D.S., Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666
- [15] Pollock J.S., Förstermann U., Mitchell J.A., Warner T.D., Schmidt H.H., Nakane M., Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991: 10480-10484
- [16] Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Löwenstein C., Reed R.R., Snyder S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-718.
- [17] Hecker M., Sessa W.C., Harris H.J., Anggard E.E., Vane J.R. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990 87: 8612-8616.
- [18] Greene B., Pacitti A.J., Souba W.W. Characterization of L-arginine transport by pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1993;264: L351-6.
- [19] Kilberg M.S., Stevens B.R., Novak D.A. Recent advances in mammalian amino acid transport. *Annu. Rev. Nutr.* 1993;13:137-165.
- [20] Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Weise M.F., Natha C.F. Purification and characterisation of cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 7773-7778

- [21] Busse R., Mulsch A., Fleming I., Hecker M. Mechanisms of nitric oxide release from vascular endothelium. *Circulation* 1993; 8: V18-V25
- [22] Fickling S.A., Leone A.M., Nussey S.S., Vallance P., Whitley G.St.J. Synthesis of N^G , N^G -dimethylarginine by human endothelial cells. *Endothelium* 1993; 1: 137-140
- [23] MacAllister R.J., Fickling S.A., Whitley G.St.J., Vallance P. Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 112: 43-48
- [24] Ghosh S.K., Paik W.K., Kim S. Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain. Myelin basic protein- and histone-specific enzyme. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 19024-19033.
- [25] Rawal N., Rajpurohit R., Paik W.K., Kim S. Purification and characterization of S-adenosylmethionine-protein-arginine N-methyltransferase from rat liver. *Biochem. J.* 1994; 300: 483-489.
- [26] Vallance P., Leone A., Calver A., Collier J., Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339: 572-575
- [27] Böger R.H., Bode-Böger S.M., Thiele W., Junker W., Alexander K., Frölich J.C. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997; 95: 2068-2074
- [28] Böger R.H., Bode-Böger S.M., Szuba A., Tsao P.S., Chan J.R., Tanphao O., Blaschke T.F., Cooke J.P. Asymmetric dimethylarginine: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterinemia. *Circulation* 1998; 98: 1842-1847
- [29] Böger R.H., Sydow K., Borlak J., Thum T., Lenzen H., Schubert B., Tsikas D., Bode-Böger S.M. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ. Res.* 2000; 87: 99-105

- [30] Ito A., Tsao P.S., Adimoolam S., Kimoto M., Ogawa T., Cooke J.P. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99: 3092-3095
- [31] Goonasekera C.D., Shah V., Rees D.D., Dillon M.J. Vascular endothelial cell activation associated with increased plasma asymmetric dimethyl arginine in children and young adults with hypertension: a basis for atheroma? *Blood Press.* 2000; 9:16-21.
- [32] Miyazaki H., Matsuoka H., Cooke J.P., Usui M., Ueda S., Okuda S., Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 1141-1146
- [33] Förstermann U., Kuk J.E., Nakane M., Pollock J.S. The expression of endothelial nitric oxide synthase is down-regulated by tumor necrosis factor (TNF- α). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1993; 347 Suppl: R61
- [34] Griffith T.M., Edwards D.H., Lewis M.J., Newby A.C., Henderson A.H. The nature of the endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1984; 308: 645-647
- [35] Mathews W.R., Kerr S.W. Biological activity of S-nitrosothiole: The role of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 267: 1529-1537
- [36] Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 7674-7677
- [37] Ramsay B., Radomski M., De Belder A., Martin J.F., Lopez-Jaramillo P. Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995;40:101-2.
- [38] Garg U.C., Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 1989; 83: 1774-1777

-
- [39] Nakai T., Nakayama M., Kato R. Inhibition by nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1990; 189: 347-353
- [40] Maggi M.F., Cristol J.P., Guerin M.C., Descomps B., Torreilles J. Protection of oxidation of LDL by nitric oxide: implication in atherosclerosis *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1995; 189: 375-387
- [41] Kanwar S., Kubes P. Nitric oxide is an antiadhesive molecule for leukocytes. *New Horiz.* 1995;3: 93-104
- [42] Khan B.V., Harrison D.G., Olbrych M.T., Alexander R.W., Medford R.M. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 9114-9119
- [43] Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. Characterisation of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 101: 325-328
- [44] Murad F., Waldman S., Molina C., Bennett B., Leitman D. Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1987; 249: 65-76
- [45] Craven P.A., De Rubertis F.R. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeprotein: evidence for the involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 8433-84443
- [46] Fleming I., Bauersachs J., Busse R. Paracrine functions of the coronary vascular endothelium. *Mol. Cell. Biochem.* 1996; 157: 137-145.
- [47] Collins T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab. Invest.* 1993; 68: 499-508

-
- [48] Zeiher A.M., Fisslthaler B., Schray-Utz B., Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ. Res.* 1995; 76: 980-986
- [49] Corbett J.A., Kwon G., Turk J., McDaniel M.L. IL-1 β induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by Islets of Langerhans: Activation of Cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry* 1993; 32: 13767-13770
- [50] Salvemini D., Settle S.L., Masferrer J.L., Seibert K., Currie M.G., Needleman P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 114: 1171-1178.
- [51] Salvemini D., Misko T.P., Masferrer J.L., Seibert K., Currie M.G., Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 7240-7244
- [52] Radi R., Beckmann J.S, Bush K.M., Freeman B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 4244-4250
- [53] Blough N.V., Zafiriou O.C. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.* 1985; 24: 3502-3504
- [54] Kissner R., Nauser T., Bugnon P., Lye P.G., Koppenol W.H. Formation and properties of peroxynitrite studied by laser flash photolysis, high pressure stopped flow and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* 1998; 10, 1285-1292
- [55] Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 1620-1624
- [56] Grisham M.B., Granger D.N., Lefer D.J. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radicals Biol. Med.* 1998; 25: 404-433

-
- [57] Beckman J.S., Chen J., Ischiropoulos H., Crow J.P. Oxidative chemistry of peroxynitrite In: Packer L. (Eds.): Oxygen radicals in biological systems. Part C. *Academic Press, New York* 1994; 229-240
- [58] Halliwell B., Zhao K., Whiteman M. Nitric oxide and peroxynitrite, The ugly, the uglier and the not so good. *Free. Radical Res.* 1999; 31: 651-669
- [59] Ischiropoulos H., al-Mehdi A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett.* 1995; 364:279-282,
- [60] Schwedhelm E., Tsikas D., Gutzki F.M., Fröhlich J.C. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of free 3-nitrotyrosine in human plasma at the basal state. *Anal. Biochem.* 1999, 276. 195-203
- [61] Landino L.M., Crews B.C., Timmons M.D., Morrow J.D., Marnett L.J. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 15069-15074
- [62] Goodwin D., Landino L., Marnett L. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J.* 13, 1121–1136 (1999)
- [63] Mascotti D.P., Rup D., Thach R.E. Regulation of iron metabolism: translational effects mediated by iron, heme, and cytokines. *Annu. Rev. Nutr.* 1995; 49: 239-61
- [64] Richardson D.R., Neumannova V., Nagy E., Ponka P. The effect of redox-related species of nitrogen monoxide on transferrin and iron uptake and cellular proliferation of erythroleukemia (K562) cells. *Blood* 1995; 86, 3211-3219
- [65] Yee E.L., Pitt B.R., Billiar T.R., Kim Y.M. Effect of nitric oxide on heme metabolism in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1996; 271, L512-L518
- [66] Oberle S., Schröder H. Ferritin may mediate SIN-1 induced protection against oxidative stress. *Nitric Oxide* 1997; 1, 308-314

- [67] Oberle S., Schwartz P., Abate A., Schröder H. The antioxidant defense protein ferritin is a novel and specific target for pentaerythryl tetranitrate in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 22: 28-34
- [68] Closs E.I., Basha F.Z., Habermeier A., Förstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y⁺ carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide* 1997; 1: 65-73.
- [69] Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 101: 746-752.
- [70] MacAllister R.J., Parry H., Kimoto M., Ogawa T., Russell R.J., Hodson H., Whitley G.S., Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 119: 1533-1540
- [71] Liao J.K., Shin W.S., Lee W.Y., Clark S.L. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 319-324.
- [72] Yoshizumi M., Perrella M.A., Burnett J.C. Jr, Lee M.E. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ. Res.* 1993; 73: 205-209.
- [73] Minor R.L. Jr, Myers P.R., Guerra R. Jr, Bates J.N., Harrison D.G. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* 1990;86:2109-16.
- [74] Mügge A., Brandes R.P., Böger R.H., Dwenger A., Bode-Böger S.M., Kienke S., Frölich J.C., Lichtlen P.R. Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesteremic rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1994; 24: 994-998
- [75] Ohara Y., Peterson T.E., Harrison D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 1993; 91: 2546-2551

- [76] Mügge A., Elwell J.H., Peterson T.E., Hofmeyer T.G., Heistad D.D., Harrison D.G. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ. Res.* 1991;69:1293-300.
- [77] Böger R.H., Bode-Böger S.M., Brandes R.P., Phivthong-ngam L., Böhme M., Nafe R., Mügge A., Frölich J.C. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 1997; 96: 1282-90
- [78] Girerd X.J., Hirsch A.T., Cooke J.P., Dzau V.J., Creager M.A. L-arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ. Res.* 1990; 67: 1301-1308.
- [79] Cooke J.P., Dzau J., Creager A. Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is corrected by L-arginine. *Basic Res. Cardiol.* 1991; 86 Suppl 2: 173-181.
- [80] Bode-Böger S.M., Böger R.H., Kienke S., Bohme M., Phivthong-ngam L., Tsikas D., Frölich J.C. Chronic dietary supplementation with L-arginine inhibits platelet aggregation and thromboxane A2 synthesis in hypercholesterolaemic rabbits in vivo. *Cardiovasc. Res.* 1998; 37: 756-64.
- [81] Tsao P.S., Theilmeyer G., Singer A.H., Leung L.L., Cooke J.P. L-arginine attenuates platelet reactivity in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler. Thromb.* 1994; 14: 1529-1533.
- [82] Tsao P.S., McEvoy L.M., Drexler H., Butcher E.C., Cooke J.P. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 1994; 89: 2176-2182.
- [83] Böger R.H., Bode-Böger S.M., Mügge A., Kienke S., Brandes R., Dwenger A., Frölich J.C. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* 1995; 117: 273-284.

-
- [84] Ignarro L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990; 30: 535-560
- [85] Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH Weselsky und Benedikt „Über einige Azoverbindungen“. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 1879; 12: 426-428
- [86] Tsikas D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2000; 72: 4064-4072
- [87] Marcus A.J., Weksler B.B., Jaffe E.A. Synthesis of Prostacyclin by Cultured Human Endothelial cells. In: Vane J.R., Berström S. (Eds.): *Prostacyclin Raven Press, New York* 1979; S, 65-76
- [88] Higgs G.A., Moncada S., Vane J.R. Prostacyclin as a potent dilator of arterioles in the hamster cheek pouch. *J. Physiol.* 1978; 275: P30-P31
- [89] Moncada S., Higgs E.A., Vane J.R. Human arterial and venous generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet* 1977;1: 18-20
- [90] Weksler B.B., Knapp J.M., Jaffe E.A. Prostacyclin synthesised by cultured endothelial cells modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Blood* 1977; 50: 282
- [91] Chen G., Suzuki H., Weston A.H. Acetylcholine releases endothelium derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* 1988; 95: 1165-1174
- [92] Taylor S.G., Weston A.H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol. Sci.* 1988; 9: 272-24.
- [93] Félétou M., Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 1988, 93: 515-524

- [94] Hu S., Kim H.S. Activation of K⁺ channels in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 230: 215-221
- [95] Gebremedhin D., Ma Y.H., Falck J.R., Roman R.J., VanRollins M., Harder D.R. Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids in cerebral arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: H519-H525
- [96] Hayabuchi Y., Nakaya Y., Matsuoka S., Kuroda Y. Endothelium-derived hyperpolarizing factor activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; 32: 642-649
- [97] Hecker M., Bara A., Bauersachs J., Busse R. Characterisation of endothelium-dependent hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J. Physiol.* 1994; 481: 407-414
- [98] Randall M.D., Alexander S.P., Bennett T., Boyd E.A., Fry J.R., Gardiner S.M., Kemp P.A., McCulloch A.I., Kendall D.A. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelexant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 229: 114-120
- [99] Edwards G., Dora K.A., Gardener M.J., Garland C.J., Weston A.H. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; 396: 269-272
- [100] Lüscher T.F., Boulanger C.M., Dohi Y., Yang Z.H. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension* 1992; 19: 117-130
- [101] Lüscher T.F., Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator *Atherosclerosis* 1995; 118: Suppl S81-S90
- [102] Gupte S. A., Okada T., Tateyama M., Ochi R. Activation of TxA₂/ PGH₂ receptors and protein kinase C contribute to coronary dysfunction in superoxide treated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000; 32: 937-946

- [103] Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Gogo K., Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 441-415
- [104] Aust S.D., Roerig D.L., Pederson T.C. Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972; 47: 1133-1137
- [105] Al-Mehdi A.B., Zhao G., Dodia C., Tozawa K., Costa K., Muzykantov V., Ross C., Blecha F., Dinauer M., Fisher A.B. Endothelial NADPH Oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circ. Res.* 1998; 83: 730-737
- [106] Brandes R.P., Koddenberg G., Gwinner W., Kim D., Kruse H.J., Busse R., Mügge A. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension* 1999; 33: 1243-1249
- [107] Kerr S., Brosnan J., McIntyre M., Reid J.L., Dominiczak A.F., Hamilton C.A. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension. *Hypertension* 1999; 33: 1353-1358
- [108] Stroes E., Hijmering M., van Zandvoort M., Wever R., Rabelink T.J., van Faassen E.E. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1998; 438: 161-164
- [109] Paky A., Michael J.R., Burke-Wolin T.M., Wolin M.S., Gurtner G.H. Endogenous production of superoxide by rabbit lung: effects of hypoxia or metabolic inhibitors. *J. Appl. Physiol.* 1993; 75: 2868-2874
- [110] Fridovich I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1970, 245: 4053-4057
- [111] Kellogg E.W., Fridovich I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 1975; 250: 8812-8817

-
- [112] Del Maestro R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.* 1980; 492: 154-168
- [113] Pou S., Pou W.S., Bredt D.S., Snyder S.H., Rosen G.M. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 24173-24176
- [114] Pritchard K.A., Groszek L., Smalley D.M., Sessa W.C., Wu M., Villalon P., Wolin M.S., Stemerman M.B. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ. Res.* 1995; 77: 510-518
- [115] Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martásek P., Hogg N., Masters B.S.S., Karout H., Tordo P., Pritchard K.A. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 9220-9225
- [116] Rabani, J., Nielsen, S. O. Absorption spectrum and decay kinetics of O₂⁻ and HO₂ in aqueous solutions by pulse radiolysis. *J. Phys. Chem.* 1969; 73: 3736-3744
- [117] Behar D., Czapski L., Dorfman M., Rabani J., Schwarz H.A., Marklund S. *J. Biol. Chem.* 1976; 251: 7504
- [118] Fridovich I. The biology of oxygen radicals - The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 1978; 201: 875-880
- [119] Johnston B., Kanwar S., Kubes P. Hydrogen peroxide induces leukocyte rolling: modulation by endogenous antioxidant mechanisms including NO. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: H614-H621
- [120] Wever R.M.F., Lüscher T.F., Cosentino F., Rabelink T.J. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998; 97: 108-112
- [121] Leeuwenburgh C., Hardy M.M., Hazen S.L., Wagner P., Oh-ishi S., Steinbrecher U.P., Heinecke J.W. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem.* 1997; 171: 1433-1436

-
- [122] Laskey R.E., Mathews W.R. Nitric oxide inhibits peroxyxynitrite-induced production of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes in phosphatidylcholine liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 330: 193-198
- [123] Rimbach G., Hohler D., Fischer A., Roy S., Virgili F., Pallauf J., Packer L. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch. Tierernähr* 1999; 52: 203-222
- [124] Bowie A.G., Moynagh P.N., O'Neill L.A. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF- κ B by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV-304. Lack of involvement of H₂O₂ in NF- κ B activation by either cytokine in both primary and transformed endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 25941-25950
- [125] Brach M.A., Hass R., Sherman M.L., Gunji H., Weichselbaum R., Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *J. Clin. Invest.* 1991; 88: 691-5
- [126] Edgington T.S., Mackman N., Fan S.T., Ruf W. Cellular immune and cytokine pathways resulting in tissue factor expression and relevance to septic shock. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* 1992; 34 Suppl: S15-27
- [127] Maziere C., Auclair M., Djavaheri-Mergny M., Packer L., Maziere J.C. Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF kappa B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996; 39: 1201-1207
- [128] Stancovski I., Baltimore D. NF- κ B activation: the I κ B kinase revealed? *Cell* 1997, 91: 299-302
- [129] Schreck R., Rieber P., Baeuerle P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991; 10: 2247-2258
- [130] Schreck R., Albermann K., Baeuerle P.A. NF- κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radical Res. Commun.* 1992; 17: 221-237

- [131] Dröge W., Holm E. Role of cysteine and glutathion in HIV infection and other diseases associated with muscle wasting and immunological dysfunction. *FASEB J.* 1997; 11: 1077-1089
- [132] Schmidt K.N., Amstad P., Cerutti P., Baeuerle P.A. Identification of hydrogen peroxide as the relevant messenger in the activation pathway of transcription factor NF- κ B. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996; 387: 63-68
- [133] Sen R., Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 91: 299-302
- [134] Thanos D., Maniatis T. NF- κ B: A lesson in family values. *Cell* 1995; 80: 529-532
- [135] Osborn L., Hession C., Tizard R., Vassallo C., Luhowskyi S., Chi-Rosso G., Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule-1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 1989; 59: 1203-1211
- [136] Elices M., Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowskyi S., Hemler M., Lobb R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/ fibronectin binding site. *Cell* 1990; 60: 577-584
- [137] Duplaa C., Couffinhal T., Labat L., Moreau C., Petit-Jean M.E., Doutre M.S., Lamaziere J.M., Bonnet J. Monocyte/ macrophage recruitment and expression of endothelial adhesion proteins in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1996 121: 253-266
- [138] Cybulsky M.I., Gimbrone M.A. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251(4995): 788-791
- [139] Li H., Cybulsky M.I., Gimbrone M.A., Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler. Thromb.* 1993; 13: 197-204
- [140] Wood K.M., Cadogan M.D., Ramshaw A.L., Parums D.V. The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis. *Histopathology* 1993; 22(5): 437-44

- [141] O'Brien K.D., Allen M.D., McDonald T.O., Chait A., Harlan J.M., Fishbein D., McCarty J., Ferguson M., Hudkins K., Benjamin C.D., et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 945-951
- [142] Shu H.B., Agranoff A.B., Nabel E.G., Leung K., Duckett C.S., Neish A.S., Collins T.S., Nabel G. Differential regulation of vascular cell adhesion molecule I gene expression by specific NF- κ B subunits in endothelial and epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 1993; 13: 6283-6289
- [143] Haklar G., Ulukaya-Durakbasa C., Yuksel M., Dagli T., Yalcin A.S. Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischaemia-reperfusion: modulation by L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998; 25: 908-912
- [144] Galey J.B., Destree O., Dumats J., Genard S., Tachon P. Protection against Oxidative Damage by Iron Chelators: Effect of Lipophilic Analogues and Prodrugs of N,N'-Bis(3,4,5-trimethoxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid. *J. Med. Chem.* 2000; 43: 1418-1421
- [145] Suzuki M., Grisham M.B., Granger D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesive interactions: role of xanthineoxidase-derived oxidants. *J. Leukoc. Biol.* 1991; 50: 488-494
- [146] Spector T. Oxypurinol as an inhibitor of xanthine oxidase-catalyzed production of superoxide radical. *Biochem. Pharmacol.* 1988; 37: 349-52
- [147] Paler-Martinez A., Panus P.C., Chumley P.H., Ryan U., Hardy M.M., Freeman B.A. Endogenous xanthine oxidase does not significantly contribute to vascular endothelial production of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994; 311: 79-85
- [148] Kolbe A.W.H. Lehrbuch der organischen Chemie 1860 249-249
- [149] Hoffmann F. US patent 644077 1900, 27. Feb.
- [150] Vane JR Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of the aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* 1971; 231: 232-235

-
- [151] Kopp E., Ghosh S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265: 956-959
- [152] Grilli M., Pizzi M., Memo M., Spano P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- κ B activation. *Science* 1996; 274, 1383-1385
- [153] Yin M.J., Yamamoto Y., Gaynor R.B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature* 1998; 396, 77-80
- [154] Aruoma O.I., Halliwell B. The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica* 1988; 18: 459-470
- [155] Woolard A.C., Wolff S.P., Bascal Z.A. Antioxidant characteristics of some potential anticataract agents: studies of aspirin, paracetamol, bendazac provide support for an oxidative component of cataract. *Free Radicals Biol. Med.* 1990; 9: 299-305
- [156] Podhaisky H.P., Abate A., Polte T., Oberle S. Schröder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidative stress: possible synergism with vitamin E. *FESB Lett.* 1997; 417: 349-351
- [157] Oberle S., Polte T., Abate A., Podhaisky H.P., Schröder H. Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells. *Circ. Res.* 1998; 82: 1016-1020
- [158] Hermann M., Kapiotis S., Hofbauer R., Exner M., Seelos C., Held I., Gmeiner B., Salicylate inhibits LDL oxidation initiated by superoxide/ nitric oxide radicals. *FEBS Letters* 1999; 445: 212-214
- [159] Exner M., Hermann M., Hofbauer R., Kapiotis S., Speiser W., Held I., Seelos C., Gmeiner B.M. The salicylate metabolite gentisic acid, but not the parent drug, inhibits glucose autoxidation-mediated atherogenic modification of low density lipoprotein. *FEBS Lett.* 2000; 470: 47-50
- [160] Shi X., Ding M., Dong Z., Chen F., Ye J., Wang S., Leonhard S.S., Castranova V., Vallyathan V. Antioxidant properties of aspirin: characterisation of the ability of aspirin to

inhibit silica-induced lipid peroxidation. DNA damage, NF- κ B activation, and TNF- α production. *Mol. Cell. Biochem.* 1999; 199: 93-102

[161] Weiss H.J., Aledort L.M., Kochwa S. The effect of salicylates on the hemostatic properties of platelets in man. *J. Clin. Invest.* 1968; 47: 2169-2180.

[162] Takahashi K., Sawasaki Y., Hata J., Mukai K., Goto T. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1990; 26: 265-274

[163] Takahashi K., Sawasaki Y. Human endothelial cell line, ECV-304, produces pro-urokinase. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1991; 27: 766-768

[164] Takahashi K., Sawasaki Y. Rare spontaneously transformed human endothelial cell line provides useful research tool. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1992; 28: 380-382

[165] Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y, Konno T. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukaemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 1980; 26: 171-176

[166] Tsuchiya S., Kobayashi Y., Goto Y., Okumura H., Nakae S., Konno T., Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukaemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 1982; 42: 1530-1536

[167] Bucolo G., David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.* 1973; 19: 476-82

[168] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275

[169] Esterbauer M., Striegel G., Puhl H., Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Comms.* 1989; 6: 67-75

-
- [170] Pritchard K.A. Jr, Tota R.R., Lin J.H., Danishefsky K.J., Kurilla B.A., Holland J.A., Stemerman M.B. Native low density lipoprotein. Endothelial cell recruitment of mononuclear cells. *Arterioscler. Thromb.* 1991;11:1175-1181.
- [171] Frostegard J., Haegerstrand A., Gidlund M., Nilsson J. Biologically modified LDL increases the adhesive properties of endothelial cells. *Atherosclerosis* 1991; 90: 119-126
- [172] Couffinhal T., Duplaa C., Labat L., Moreau C., Bietz I., Bonnet J. Effect of low density lipoprotein on monocyte adhesiveness to endothelial cells in vitro. *Atherosclerosis* 1993 Feb; 99: 35-45.
- [173] Alderson L.M., Endemann G., Lindsey S., Pronczuk A., Hoover R.L., Hayes K.C. LDL enhances monocyte adhesion to endothelial cells in vitro. *Am. J. Pathol.* 1986; 123: 334-42
- [174] Abe Y., El-Masri B., Kimball K.T., Pownall H., Reilly C.F., Osmundsen K., Smith C.W., Ballantyne C.M. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998; 18: 723-31.
- [175] Hoogerbrugge N., Verkerk A., Jacobs M.L., Postema P.T., Jongkind J.F. Hypertriglyceridemia enhances monocyte binding to endothelial cells in NIDDM. *Diabetes Care* 1996; 19: 1122-1125.
- [176] Sparrow C.P., Olszewski J. Cellular oxidative modification of low density lipoprotein does not require lipoxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 128-131
- [177] Adcock I.M., Brown C.R., Kwon O., Barnes P.J. Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 199: 1518-24
- [178] Telek G., Ducroc R., Scoazec J.Y., Pasquier C., Feldmann G., Roze C. Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *J. Surg. Res.* 2001; 96: 56-67.

-
- [179] Carlos T.M., Schwartz B.R., Kovach N.L., Yee E., Rosa M., Osborn L., Chi-Rosso G., Newman B., Lobb R., Rosa M., et al. Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 1990 1; 76: 965-970.
- [180] Marui N., Offermann M.K., Swerlick R., Kunsch C., Rosen C.A., Ahmad M., Alexander R.W., Medford R.M. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 1866-1874
- [181] Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999; 222: 196-204
- [182] Martin A., Foxall T., Blumberg J.B., et al. Vitamin E inhibits low-density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cells in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 429-46
- [183] Erl W., Weber C., Wardemann C. et al. alpha-Tocopheryl succinate inhibits monocytic cell adhesion to endothelial cells by suppressing NF-kappa B mobilization. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: H634-H640
- [184] Cominacini L., Garbin U., Pasini A.F., Davoli A., Campagnola M., Contessi G.B., Pastorino A.M., Lo Cascio V. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Radicals Biol. Med.* 1997; 22: 117-127
- [185] Weber C., Erl W., Pietsch A., Ströbel M., Ziegler-Heitbrock H.W., Weber P.C. Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler. Thromb.* 1994; 14: 1665-1673
- [186] Fruebis J., Silvestre M., Shelton D., Napoli C., Palinski W. Inhibition of VCAM-1 expression in the arterial wall is shared by structurally different antioxidants that reduce early atherosclerosis in NZW rabbits. *J. Lipid Res.* 1999; 40: 1958-1966.

-
- [187] Jialal I., Fuller C.J. Oxidized LDL and antioxidants. *Clin. Cardiol.* 1993 Apr;16:I6-9.
- [188] Jialal I., Vega G.L., Grundy S.M. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1990; 82: 185-191.
- [189] Jialal I., Grundy S.M. Preservation of the endogenous antioxidants in low density lipoprotein by ascorbate but not probucol during oxidative modification. *J Clin Invest.* 1991; 87: 597-601
- [190] Frei B., Forte T.M., Ames B.N., Cross C.E. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid. *Biochem. J.* 1991; 277: 133-138.
- [191] Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991; 54: 1119S-1124S.
- [192] Sies H. Stahl W. Sundquist A.R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992; 669: 7-20.
- [193] Balla J., Belcher J.D., Balla G., Jacob H.S., Vercellotti G.M. Oxidized low-density lipoproteins and endothelium: oral vitamin E supplementation prevents oxidized low-density lipoprotein-mediated vascular injury. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1993; 106: 128-33.
- [194] Belcher J.D., Balla J., Balla G., Jacobs D.R. Jr, Gross M., Jacob H.S., Vercellotti G.M. Vitamin E, LDL, and endothelium. Brief oral vitamin supplementation prevents oxidized LDL-mediated vascular injury in vitro. *Arterioscler. Thromb.* 1993; 13: 1779-89.
- [195] Retsky K.L., Frei B. Vitamin C prevents metal ion-dependent initiation and propagation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995 3; 1257: 279-287.
- [196] Carr A.C., Zhu B.Z., Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ. Res.* 2000 Sep 1; 87: 349-354.

- [197] Lehr H.A., Frei B., Olofsson A.M., Carew T.E., Arfors K.E. Protection from oxidized LDL-induced leukocyte adhesion to microvascular and macrovascular endothelium in vivo by vitamin C but not by vitamin E. *Circulation* 1995; 91:1525-1532.
- [198] Halliwell B., Wasil M., Grootveld M. Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. Implications for antioxidant protection in the inflamed rheumatoid joint. *FEBS Lett.* 1987; 213: 15-17.
- [199] Lehr H.A., Frei B., Arfors K.E. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 7688-7692.
- [200] Chiu J.J., Wung B.S., Shyy J.Y., Hsieh H.J., Wang D.L. Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 3570-3577
- [201] Lehr H.A., Becker M., Marklund S.L., Hubner C., Arfors K.E., Kohlschütter A., Messmer K. Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler. Thromb.* 1992; 12: 824-829
- [202] Zuo L., Christofi F.L., Wright V.P., Liu C.Y., Merola A.J., Berliner L.J., Clanton T.L. Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000; 279: C1058-C1066.
- [203] Haberland A., Schimke I., Papias B. Does the measurement of xanthine oxidase (XOD)/xanthine dehydrogenase (XDH) ratio reflect the actual tissue content of these enzymes? *Biomed. Biochim. Acta* 1989; 48: S114-S117.
- [204] Granger D.N., Benoit J.N., Suzuki M., Grisham M.B. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* 1989; 257: G683-G688.
- [205] Pierce J.W., Read M.A., Ding H., Luscinskas F.W., Collins T. Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J. Immunol.* 1996 15; 156: 3961-3969.

-
- [206] Gerli R., Paolucci C., Gresele P., Bistoni O., Fiorucci S., Muscat C., Belia S., Bertotto A., Costantini V. Salicylates inhibit adhesion and transmigration of T lymphocytes by preventing integrin activation induced by contact with endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 2389-2398.
- [207] Zünd G., Dzus A.L., Pretre R., Niederhäuser U., Vogt P., Turina M. Endothelial cell injury in cardiac surgery: salicylate may be protective by reducing expression of endothelial adhesion molecules. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 1998; 13: 293-297
- [208] Weber C., Erl W., Pietsch A., Weber P.C. Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 1995 1; 91: 1914-1917
- [209] Wang X. A chelate theory for the mechanism of action of aspirin-like drugs. *Med. Hypotheses* 1998; 50: 239-251
- [210] Kukreja R.C., Kontos H.A., Hess M.L., Ellis E.F. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ. Res.* 1986; 59: 612-619.
- [211] Samuelsson B. On the incorporation of oxygen in the conversion of 8,11,14-Eicosatrienoic acid to prostaglandin E₁. *J. Am. Chem. Soc.* 1965 87, 3011-3013.
- [212] Morrow J.D., Roberts L.J. Quantification of noncyclooxygenase derived prostanoids as a marker of oxidative stress. *Free Radicals Biol. Med.* 1991;10:195-200.
- [213] Iademarco M.F., McQuillan J.J., Rosen G.D., Dean D.C. Characterization of the promotor for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 16323-16329
- [214] Neish A.S., Williams A.S., Palmer H.S., Whitley M.Z., Collins T. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule-1 promotor. *J. Exp. Med.* 1992; 176: 1583-1593
- [215] Peng H.B., Libby P., Liao J.K. Induction and stabilization of I κ B- α by nitric oxide mediates inhibition of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 14214-14219

- [216] De Caterina R., Libby P., Peng H.B., Thannickal V.J., Rajavashisth T.B., Gimbrone M.A. Jr, Shin W.S., Liao J.K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 60-68.
- [217] Erl W., Weber C., Wardemann C., Weber P.C. alpha-Tocopheryl succinate inhibits monocytic cell adhesion to endothelial cells by suppressing NF-kappa B mobilization. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: H634-40.
- [218] Halliwell B., Gutteridge J.M. Iron as a biological pro-oxidant. *ISI Atlas of science-Biochemistry* 1, 1988; 48-52
- [219] Betts W.H., Whitehouse M.W., Cleland L.G., Vernon-Roberts B. In vitro antioxidant properties of potential biotransformation products of salicylate, sulphasalazine and amidopyrine. *J. Free Radicals Biol. Med.* 1985; 1: 273-80.
- [220] Cleland L.G., Whitehouse M.W., Betts W.H. Gentisate, a salicylate metabolite with antioxidant properties. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1985; 11: 463-467
- [221] Pantopoulos K., Hentze M.W. Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. *EMBO J.* 1995; 14: 2917-2924.
- [222] Chang G.J., Woo P., Honda H.M., Ignarro L.J., Young L., Berliner J.A., Demer L.L. Oxidation of LDL to a biologically active form by derivatives of nitric oxide and nitrite in the absence of superoxide. Dependence on pH and oxygen. *Arterioscler. Thromb.* 1994; 14: 1808-1814.
- [223] Strein K., Bartsch W., Sponer G., Müller-Beckmann B., Lexa P. Differences in the nitrite ion formation and the toxicological findings between isosorbide dinitrate and isosorbide-5-mononitrate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984; 72: 142-147.
- [224] Chan J.R., Böger R.H., Bode-Böger S.M., Tangphao O., Tsao P.S., Blaschke T.F., Cooke J.P. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1040-1046.

[225] Böger R.H., Bode-Böger S.M., Tsao P.S., Lin P.S., Chan J.R., Cooke J.P. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36: 2287-2295

[226] Matthews J.R., Botting C.H., Panico M., Morris H.R., Hay R.T. Inhibition of NF- κ B DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 2236-2242

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die vorliegende Arbeit nicht schon als Diplomarbeit oder in anderer Form veröffentlicht wurde und dass ich diese Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Hiltrizhausen, den 23.09.2001

Tabellarischer Lebenslauf

Guido Wohlers
Lisztstr. 8
71157 Hildrizhausen
g.wohlers@web.de

Geburtstag,
Geburtsort: 10.August 1971 in Oldenburg

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1978 – 1982 kath. Grundschule Eversten,
Oldenburg
1982 – 1984 Orientierungsstufe Paulus-Schule,
Oldenburg
1984 - 1991 Gymnasium Liebfrauenschule
Oldenburg

Schulabschluß: Abitur, Mai 1991

Wehrdienst: 1991 - 1992 als Sanitätssoldat

Studium: Okt. 1992 - Mai 1997 an der TU Braunschweig;
anschließend Praktisches Jahr in der
Graf-Anton-Günther-Apotheke in Oldenburg bis
Mai 1998; Staatsexamen im Juni 98

weiterer Werdegang: Beginn der Promotion am Institut für Klinische
Pharmakologie der Medizinischen Hochschule
Hannover im Juli 1998; parallel dazu Teilzeitstelle
in der Michaelis-Apotheke Hannover; seit
September 2000 Fortsetzung der Promotion im
Institut für Pharmazie der Universität Hamburg

Guido Wohlers
Hildrizhausen, 23. September 2001