

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Hamburg , Abteilung für Pharmakologie

Direktor : Prof. Dr. H. Scholz

und

der Abteilung für Pharmakologie der Firma Eli Lilly Research Laboratories, Lilly
Forschung GmbH Hamburg

Leiter : Prof. Dr. H.-J. Mest

**Einfluss einer Glukosebelastung auf Kontraktion und Relaxation
von Aortenringen des Kaninchens und der SHSP-Ratte:
Wirkung von Imidazolinen und Protein-Kinase-Hemmern.**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt
von

Florian A. Szabados
aus Hamburg

Hamburg 2001

1	EINLEITUNG.....	5
1.1	Diabetes mellitus	5
1.1.1	Definition und Epidemiologie.....	5
1.1.2	Bedeutung der Glukose für Kontraktion	7
1.1.3	Bedeutung der Glukose für Relaxation	7
1.1.4	Bedeutung der Glukose für langfristige Schäden an der Gefäßwand.	8
1.2	Adrenerge Rezeptoren.....	9
1.3	Imidazolinrezeptoren	11
1.3.1	Geschichtliche Entwicklung der Imidazoline.....	11
1.3.2	Bedeutung der Imidazoline für den Typ 2 Diabetes Mellitus.....	13
1.4	Protein Kinase C.....	14
1.4.1	Biochemische Grundlagen.....	14
1.4.2	Bedeutung der PKC bei Diabetes mellitus:.....	15
1.4.3	PKC β als besondere Isoform der Proteinkinase.....	17
1.5	Fragestellung der Arbeit.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Chemikalien und Labormaterial.....	19
2.2	Nährlösung:.....	19
2.3	Versuchsaufbau isolierter Aortenringe	20
2.4	Tiere	21
2.5	Auswertung und Ein- und Ausschlusskriterien.....	23
2.6	Statistik	23
3	ERGEBNISSE	24
3.1	Einfluss von Glukose auf Kontraktion und Relaxation von Aortenringen des Kaninchens	24
3.1.1	Einfluss von Glukose auf die Kontraktion	24
3.1.2	Einfluss von Glukose auf die Relaxation durch Acetylcholin	25
3.2	Einfluss von Imidazolin auf Relaxation.....	28
3.3	Einfluss von Staurosporin auf die Relaxation.....	43
3.4	Einfluss von Glukose auf Kontraktion und Relaxation von Aortenringen der SHSP-Ratte	44
3.4.1	Einfluss von Inkubationszeit auf die Relaxation durch Acetylcholin	49
3.4.2	Einfluss von Glukose auf die Relaxation durch Acetylcholin	51
3.4.3	Einfluss von Imidazolin auf Relaxation und Kontraktion	55
3.4.4	Einfluss von Imidazolin auf die Relaxation durch Acetylcholin	55
3.4.4.1	Einfluss von Moxonidin auf die Relaxation.....	55
3.4.4.2	Einfluss von Clonidin auf die Relaxation	56
3.4.5	Einfluss des PKC-Hemmers LY333531 auf die Relaxation durch Acetylcholin	58

4	DISKUSSION	61
4.1	Kontraktion und Relaxation.....	61
4.2	Wirkungsmechanismus von Imidazolinen bei Kontraktions und Relaxationsvorgängen	71
4.3	Wirkung von Proteinkinase C an hyperglykämisch veränderten Gefäßen.....	75
4.4	Klinische Aussichten.....	78
5	ZUSAMMENFASSUNG	80
6	DANKSAGUNG.....	83
7	LITERATURVERZEICHNIS	84
8	ANHANG.....	102

Abkürzungsverzeichnis:

ACH	Acetylcholin
ADA	American Diabetes Association
(c)ATP	(cyclisches) Adenosin-Tri-Phosphat
(c)DNA	(cloned) Desoxyribonukleinsäure (-acid)
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDRF	endothelial derived relaxation factor
EDCF	endothelial derived contracting factor
GLUT ₁	Glukose Transporter 1
IP3	Inositoltriphosphat
(m)RNA	(mitochondriale) Ribonukleinsäure (-acid)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid- Synthase
ecNOS	endotheliale konstituive NOS
i NOS	induzierbare NOS
nNOS	neurale NOS
L-NNA	N ^G -Nitro-L-Arginin
LY333531	(S)-13-[(Dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16,21 - dimetheno1H,13H-dibenzo (e, k) pyrrolo (3,4,-h) (1,4,13) oxadiazacyclohexadecen-1,3 (2H)-dion
NRL	Nucleus reticularis lateralis
PHE	Phenylephrin
PKC(β)	Proteinkinase C (β-Selektiv)
PDBu	Phorbol dibutytrat
Pi PL C	phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C
cPLA2	Ca ²⁺ -sensitiven Phospholipase A ₂
RVLM	rostromedullärer Teil der Medulla
SHSP	spontaneously hypertensive stroke prone
UKPDS	United Kingdom prospective Diabetes Study
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Der Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten oder relativen Mangel an Insulin beruht und in deren Folge zumeist erst nach längerer Krankheitsdauer Schäden an Blutgefäßen und Nervensystem auftreten können. Nach einer Definition der WHO / American Diabetes Association (ADA) von 1997 werden folgende Typen unterschieden:

1. Typ 1 Diabetes: β -Zelldestruktion, die zum absoluten Insulinmangel führt und kann immunologisch bedingt sein oder idiopathisch vorkommen.
2. Typ 2 Diabetes: Dieser kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken.
3. Andere Spezifische Typen, wie
 - genetische Defekte der β -Zellfunktion
 - seltene genetische Defekte der Insulinwirkung
 - Krankheiten des exokrinen Pankreas
 - Endokrinopathien
 - medikamentös induziert
 - Infektionen
 - seltene immunologisch bedingte Formen
4. Gestationsdiabetes.

Der Typ 2 Diabetes macht etwa 90% aller Fälle von Diabetes in entwickelten Ländern aus und ist eine wichtige Ursache von Morbidität und Mortalität. Diese Krankheit hat daher eine starke sozioökonomische Bedeutung in diesen Ländern, gerade unter dem Aspekt, dass die Prävalenz dieser Erkrankung in den letzten Jahren in Deutschland zugenommen hat.^[69]

Vaskuläre Komplikationen von Diabetes mellitus zeigen sich in sowohl Mikro- als auch Makroangiopathien.^[1,109]

Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 und einer Hypertonie haben eine sehr viel höhere Prävalenz für Schlaganfälle und ischämische Episoden.^[47] Sowohl Diabetes mellitus als auch arterielle Hypertonie sind weiterhin zwei unabhängige Risikofaktoren für Atherosklerose.^[24,47]

Vaskuläre diabetische Komplikation betreffen am häufigsten die Retina, die Nierenglomerula und das kardiovaskuläre System, einschließlich des Herzens. Vor 1921 war die häufigste Todesursache, die diabetische Ketoazidose und das ketoazidotische Koma.

Nach der Erforschung des Insulins und der Einführung der Insulintherapie im Jahre 1921 sind die häufigsten Ursachen von Morbidität und Mortalität diabetischer Patienten heute die kardiovaskulären Komplikationen, wie die des Herzens, der grossen Arterien und das Nierenversagen.^[89]

Vaskuläre Komplikationen bei Diabetes mellitus sind chronische Erkrankungen und benötigen 10 bis 20 Jahre um sich zu manifestieren. Der Schweregrad der vaskulären Veränderungen kann von genetischen Faktoren beeinflusst werden, da es diabetische Patienten gibt, welche kaum vaskuläre Komplikationen haben, obwohl ihr Diabetes sehr schlecht eingestellt war.

Einer der wichtigsten Faktoren für die Pathogenese vaskulärer Komplikationen ist die metabolische Umgebung dieser diabetischen Patienten und hier speziell die Hyperglykämie.^[1,89,109]

Auch die arterielle Hypertonie ist eine der häufigeren Erkrankungen in westlichen Industrienationen. Die Prävalenz beider Erkrankungen steigt mit höherem Alter. Obwohl Diabetes mellitus schon für sich ein Risiko für Gefäßerkrankungen darstellt,^[98] kommt es bei gleichzeitigem Vorkommen von arterieller Hypertonie zu einer verstärkten Ausprägung von Gefäßerkrankungen.^[24]

1.1.2 Bedeutung der Glukose für Kontraktion

Die chronische Hyperglykämie ist in der Lage über mehrere Mechanismen die Entwicklung von Hypertonie zu fördern. Im Tiermodell führt eine Hyperglykämie zu einer Hypertonie.^[12] Es wurde festgestellt, dass die Hyperglykämie zu einer Na^+ -Retention und zu einer Zunahme des austauschbaren Körper- Na^+ -Bestandes führt.^[113] Hyperglykämie bewirkt eine glomeruläre Hyperfiltration von Glukose, welche dann über eine Aktivierung des proximal tubulären Glukose- Na^+ -Cotransporters die proximal tubulären Na^+ -Konzentration und die Aktivität der Na^+ - K^+ -ATPase erhöht.^[55] Chronische Hyperglykämie ist eine Ursache von verstärkter vaskulärer Rigidität aufgrund von strukturellen Umbauvorgängen.

In hohen Konzentrationen scheint Glukose sogar einen direkten toxischen Effekt auf humane Endothelzellen zu haben.^[65]

Glukose kann so zu verringerter endothelabhängiger Relaxation, vermehrter Kontraktion, Entwicklung von Hyperplasie bei glatten Gefäßmuskelzellen und einem vaskulären Umbau (Remodeling) führen.

Es wurde gezeigt, dass hohe Glukosespiegel in humanen glatten Gefäßmuskelzellen eine Überexpression von Fibronectin und Kollagen 4 induzieren können.^[97]

Weiterhin wurde gezeigt, dass in einer hyperglykämischen Umgebung nichtenzymatische Glykolysierungsprodukte beschleunigt gebildet werden, welche sich dann in der Gefäßwand anreichern. Die Rate dieser Anreicherung ist proportional mit dem Integral der Blutglukosekonzentration über die Zeit.^[13]

1.1.3 Bedeutung der Glukose für Relaxation

Die Relaxation der Gefäße wird über verschiedene vasodilatierende Substanzen aus unterschiedlichen Gewebearten hervorgerufen, von denen das Endothel die bedeutendste Funktion übernimmt. Es sollen vom Endothel verschiedene Relaxationsfaktoren^[32] gebildet werden, von denen als der Wichtigste Stickstoffmonoxid NO ^[85] identifiziert worden ist, beziehungsweise Derivate,^[77] die von der Aminosäure L-Arginin abstammen.^[84] Das NO wird von der NOS (Nitric Oxide Synthase) katalysiert, einem Enzym, welches in drei verschiedenen Formen vorkommt.

Es lassen sich eine konstitutive (cNOS) von einer neuronalen (nNOS) und einer induzierbaren Form (iNOS) der NOS unterscheiden. Die Höhe des Blutglukosespiegels und der fortgeschrittenen Glykolyseendprodukte können die Aktivität der NOS (Nitric Oxide Synthase) beeinflussen.^[15,19,46] Über eine Aktivierung der Proteinkinase C durch die erhöhte Glukose^[103,117] wird eine weitere Wirkung auf die NOS ausgeübt. PKC soll die Aktivität der ecNOS (endothelial constitutive NOS) mindern.^[82]

1.1.4 Bedeutung der Glukose für langfristige Schäden an der Gefäßwand.

Die kausalen Faktoren der Atherosklerose sind zum großen Teil bekannt. An erster Stelle ist die Hyperlipidämie zu nennen. Insbesondere eine Erhöhung des an LDL gebundenen Cholesterins ist ein wichtiger atherogener Faktor.

Ein weiterer Risikofaktor ist die arterielle Hypertonie.^[47] Die Ätiologie der arteriellen Hypertonie ist dabei unerheblich.

Der Diabetes mellitus mit seinen metabolischen Entgleisungen, insbesondere Hyperglykämien und Lipidstoffwechselstörungen, ist ebenfalls Risikofaktor erster Ordnung und aufgrund der Häufigkeit ein besonders wichtiger Faktor.^[1,109]

Von Risikofaktoren erster Ordnung werden Risikofaktoren zweiter Ordnung abgegrenzt. Hierzu gehören Adipositas, Hyperurikämie, Stress, Bewegungsmangel und ein durch Vererbung determiniertes Risiko, sowie weitere in der Literatur diskutierte Faktoren.

Die Ursachen und Mechanismen der makrovaskulären Gefäßveränderungen bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 sind bis heute nur unvollständig bekannt. Es gibt gut belegte Hinweise dafür, dass Insulinresistenz und hohe Insulinkonzentrationen dabei eine wichtige Rolle spielen.^[22,24,93]

Es ist bekannt, dass Insulinresistenz mit einer Erhöhung von Triglyzeriden, einer Erniedrigung des HDL und einer Tendenz zur arteriellen Hypertonie vergesellschaftet ist,^[120] zusätzlich zu seinem Lipideffekt.

Sowohl die Diabetes Control and Complication Trial Studie als auch die United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) haben gezeigt, dass eine gute Einstellung des Diabetes, also das Vermeidung von Hyperglykämien das Erscheinen von Mikroangiopathien und Neuropathien verhindern und kardiovaskuläre Schäden vermindern kann.^[107,109] Eine große Anzahl von Studien haben eine mögliche Rolle der Hyperglykämie und deren Mechanismen bei der Induktion von Gefäßveränderungen beschrieben.^[15,19,39,51,57,88,103,105,115]

Es gibt gut belegte Hinweise, dass Stickstoffmonoxid (NO) in der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt.^[90]

NO soll nicht nur eine relaxierende Wirkung auf das Gefäß haben sondern soll auch die Plättchen-Adhäsion, -Aggregation und Zellproliferation beeinflussen.^[90]

Auch bei der Atherosklerose findet man Veränderungen von ecNOS und der nNOS.^[114] In verschiedenen Tiermodellen gibt es zur Zeit unterschiedliche Aussagen bezüglich der ecNOS-Aktivität im Endothel. Es häufen sich aber Annahmen, dass im Rahmen der Atherosklerose ecNOS-Protein und ecNOS- mRNA vermindert sind.^[15,114] In verschiedenen pathophysiologischen Modellen wurde allerdings auch von gegensätzlichen Annahmen ausgegangen.^[19]

1.2 Adrenerge Rezeptoren

Adrenerge Rezeptoren vermitteln die zentrale und periphere Wirkung des vorwiegend sympathischen Neurotransmitters Noradrenalin und des überwiegend in der Nebenniere produzierten Hormons Adrenalin.

Historisch wurden die Adrenozeptoren in α - und β -Rezeptoren eingeteilt, in α_1 -, α_2 - und β - (1,2,3 und 4)-Rezeptoren. Diese Unterteilung wird durch Affinitätsvergleiche gestützt. Ein weiterer Anhalt ist die unterschiedliche Wirkung auf second messenger Systeme in den Zielzellen.^[14]

Charakteristik von α_1 -Rezeptoren

Alle Subtypen werden von Adrenalin und Noradrenalin gleichermaßen aktiviert.

Es gibt keine bedeutenden Affinitätsunterschiede von den beiden Neurotransmittern zu bekannten α_1 -Subtypen.^[14] Alle α_1 -Rezeptoren aktivieren ihrerseits ein G-Protein der G_q -Familie, welches die phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C (PI-PL C) stimuliert. Als second messenger entstehen Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin; IP_3 setzt aus dem endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} frei; Diacylglycerin aktiviert die Proteinkinase C, die spezifische Zielproteine phosphoryliert.^[31]

Derzeit stehen vier pharmakologisch definierten Rezeptorsubtypen α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} und α_{1D} 3 rekombinante Rezeptorsubtypen $\alpha_{1a/d}$, α_{1b} und α_{1c} gegenüber. Lediglich der α_{1b} -Typ ist mit großer Übereinstimmung in der Literatur in sowohl Mensch, Ratte und Hamster dem Typ α_{1B} zuzuordnen.^[14]

Bei den anderen Subtypen bestehen noch zu klärende Unterschiede in pharmakologischem Verhalten und Speziesabhängigkeit.

Charakteristik von α_2 -Rezeptoren

Alle Subtypen werden von Adrenalin und Noradrenalin gleichermaßen aktiviert. Es gibt es keinen Anhalt für bedeutende Affinitätsunterschiede von den beiden Neurotransmittern zu den bekannten α_2 -Subtypen.^[14] Die α_2 -Rezeptoren, wenn aktiviert, aktivieren ihrerseits ein G-Protein der G_i -Familie; dieses hemmt entweder die Adenylylcyclase, so dass die intrazelluläre Konzentration von cAMP sinkt, oder es erhöht die Offenwahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen, oder es vermindert die Offenwahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen.^[31]

Den pharmakologisch definierten Subtypen (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , α_{2D}) stehen 3 rekombinante α_2 -Subtypen α_2C10 ^[52], α_2C2 ^[64] und α_2C4 ^[94] gegenüber.

1.3 Imidazolinrezeptoren

1.3.1 Geschichtliche Entwicklung der Imidazoline

Bei der Entwicklung strukturanaloger Substanzen zum Clonidin, fanden sich Substanzen, die geringere Nebenwirkungen haben als Clonidin. Die Ergebnisse dieser Studien deuteten auf die Existenz einer neuen Klasse von Rezeptoren hin, welche eine hohe Affinität zu spezifischen imidazolin-ähnlichen Verbindungen hatten, und sich in Ihren Eigenschaften von α_2 -adrenergen Rezeptoren unterschieden. Als Wirkort dieser zentral wirksamen Substanzen wurde der Nucleus reticularis lateralis (NRL) des rostroventrolateralen Teil der Medulla Oblongata (RVLM) vermutet.^[11] Einige Autoren nahmen schon damals an, dass präsynaptische α_2 -adrenerge Rezeptoren nicht für zentrale kardiovaskuläre Wirkung von Clonidin verantwortlich sind.

Spezifische Imidazolin-Bindungsstellen

Von Bousquet et al.^[9] wurden α_2 -adrenergen Rezeptoren von einer neuen Klasse, den Imidazolinrezeptoren unterschieden, aber erst Ernsberger^[28] konnte 1987 zeigen, dass es spezifische Imidazolin-Bindungsstellen gibt.

Schon von Michel wurde 1989 vermutet, dass es verschiedene Imidazolinrezeptoren gibt,^[71] der Beweis fehlte jedoch.

Seit 1992 ist durch die Arbeit von Ernsberger und Michel^[70] die Nomenklatur akzeptiert, bei der I₁-Imidazolinrezeptoren mit [³H]-Clonidin und I₂-Imidazolinrezeptoren durch [³H]-Idazoxan charakterisiert werden.

[³H]-Clonidin bindet auch mit geringerer Affinität an I₂-Imidazolinrezeptoren, [³H]-Idazoxan jedoch nicht an I₁-Imidazolinrezeptoren.

Imidazolinrezeptoren werden in unterschiedlichen Spezies wie Mensch, Rind, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Hund vermutet.^[9]

Im Jahre 1994 wurde der endogene Ligand für den Rezeptor, welcher vorher als "Clonidin Displacing Substance" bezeichnet wurde, beim Kaninchen, als Agmatin, einem decarboxilierten Arginin vermutet.^[102]

I₁-Agonisten zeichnen sich durch ihren antihypertensiven Effekt aus. Dabei scheint über zentrale I₁-Rezeptoren an der rostralen ventrolateralen Medulla der Sympatikus gehemmt zu werden.^[26,27] In der folgenden **Tabelle 1**, sind verschiedene Imidazolin-Rezeptoren beeinflussende Substanzen dargestellt mit Ihren jeweiligen Affinitäten zu α und Imidazolinrezeptoren.

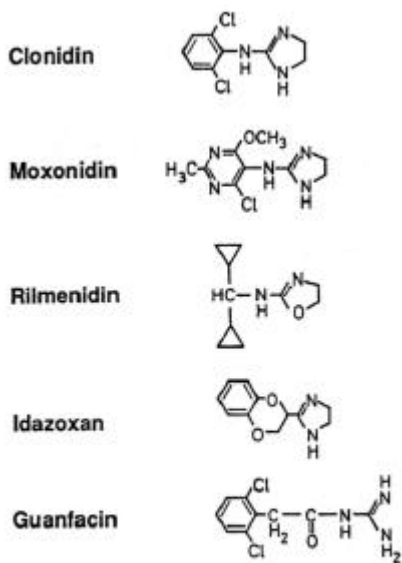
Tabelle 1 Imidazolin-Rezeptoren beeinflussende Wirkstoffe

Substanz ^[26]	K nM I ₁ -	K nM α_2 -	I ₁ - / α_2 -Ratio
Moxonidin ^[26]	2,3±0,5	75±8	32,61
Rilmenidin ^[26]	6,1±1,5	180±14	29,51
Clodinin ^[26]	1,0±0,3	3,8±1,0	3,80
Guanfacin ^[27]	2500±190	2,3±0,7	0,00092
Idazoxan ^[27]	186±17	3,6±0,85	0,01935

Moxonidin ist als bisher stärkster selektiver I₁-Agonist, als zentrales Antihypertensivum zugelassen.

Für Nebenwirkungen, wie Sedation oder Mundtrockenheit, soll die α_2 - adrenerge Wirkung der zentral wirksamen Antihypertensiva verantwortlich sein.

Moxonidin besitzt daher im Vergleich zu dem klassischen zentralen α_2 -Agonisten Clonidin bei gleicher Wirkung weniger Nebenwirkungen.



Periphere Imidazolinwirkung

I₁-Imidazolinrezeptoren werden zentral im Hirnstamm vermutet. Inwieweit weitere Gewebe außerhalb des zentralen Nervensystems, wie unter anderem das Gefäßendothel^[34], Bindungsstellen für I₁-Imidazolinrezeptoren enthalten und ob diese prä- oder postsynaptisch sind, ist Gegenstand derzeitiger Forschung.^[34,35,72,73]

Weiterhin gibt es Hinweise, dass Imidazolinrezeptoren in verschiedenen Geweben, wie im Gehirn, Aorta, Nieren, Leber, Vas deferenz, Thrombozyten und Pankreas existieren sollen. I₂-Imidazolinrezeptoren sollen an der externen Membran von Mitochondrien lokalisiert und sollen in vielen Geweben zu finden sein. Darunter finden sich Gewebe wie Prostata, Vas deferenz und Nierengewebe.^[59] Es wird ein Zusammenhang zwischen diesen I₂-Imidazolinrezeptoren mit Monoaminoxidasen vermutet.^[61]

Weiterhin sollen Imidazolin- Agonisten die Noradrenalin und Plasmakatecholaminspiegel über periphere präsynaptische Imidazolin- und α_2 -adrenerge Rezeptoren senken.^[34] Dabei soll die Senkung durch Imidazoline unabhängig von α_2 -adrenergen Rezeptoren sein.^[35] Weiterhin soll es Unterschiede im Verhalten dieser Substanzen an der Aorta vom Kaninchen geben, daraus wird gefolgert, dass es an der Aorta des Kaninchens weitere Subtypen von Imidazolin Rezeptoren geben soll.^[73]

1.3.2 Bedeutung der Imidazoline für den Typ 2 Diabetes Mellitus

Zentrale Wirkung der Imidazoline

Es gibt viele Steuerungsmechanismen der Insulinsekretion, von denen der Blutglukosespiegel sicher der Wichtigste ist. Die Insulinabgabe wird von parakrinen Einflüssen verändert, so können u.a. Somatostatin oder Gukagon die Insulinsekretion beeinflussen.

Die kephalische Phase der Insulinsekretion soll über eine Abgabe von Acetylcholin aus den parasympatischen Nerven eingeleitet werden, während aus der Stimulation des sympathischen Nervensystems eine Noradrenalinabgabe resultiert, welche die Insulinsekretion hemmt.^[23,44]

So konnte am Tiermodel,^[96] wie auch schon bei Patienten^[62] gezeigt werden, dass Zustände mit erhöhten Blutglukosespiegeln nach Gabe von Moxonidin gesenkt werden können.^[44]

Der selektive Einsatz von Imidazolinrezeptor Agonisten, wie Moxonidin bei Patienten mit einer arteriellen Hypertonie und gleichzeitig bestehender Glukoseintoleranz oder Dyslipidämie ist daher eine logische Therapieüberlegung.^[54]

Periphere Wirkung der Imidazoline

Moxonidin hat an isolierten Inselzellen eine biphasische Wirkung, die bei Konzentrationen von 10 bis 1000 nM Moxonidin die Insulinsekretion fördert.^[96]

Der Mechanismus, welcher die Ausschüttung von Insulin bewirkt, ist noch unklar, es wird jedoch ein direkter oder indirekter hemmender Einfluss auf ATP-sensitive- K^+ -Kanäle (K^+_{ATP})^[23], bzw. eine Wirkung über Imidazolinrezeptoren vermutet. Für Imidazolinrezeptoren, die an der Insulinausschüttung am Pankreas beteiligt sind, wird vermutet, dass sich die Rezeptoren von I_1 - und I_2 -Rezeptoren unterscheiden^[16] und werden als I_3 -Rezeptoren diskutiert.

1.4 Protein Kinase C

1.4.1 Biochemische Grundlagen

Die Proteinkinase C ist eine Familie von Kinasen mit mindestens 8 Isoenzymen.^[38] Die PKC wurde ursprünglich als Serin-Threonin-spezifische Kinase isoliert. Es konnte jedoch später gezeigt werden, dass auch Ca^{2+} , Phospholipide und Diacylglycerin (DAG) das native Enzym stimulieren können.

Die vier Isoenzyme (γ -, β_1 - und β_2 - und α -Isoform) benötigen Ca^{2+} , Phospholipide oder DAG für ihre Aktivität, obwohl für die einzelnen Isoformen Unterschiede in der Abhängigkeit von sowohl den Kofaktoren als auch den Substraten der einzelnen Kinasen bestehen.^[2,100] Aufgrund ihrer Ähnlichkeiten wurden sie als Gruppe A Proteinkinasen zusammengefasst.

Die Hybridisierung von Restriktionsfragmenten von α -, β_2 - und γ -cDNA Proben mit Rattenhirn-cDNA-Komponenten führte zur Isolierung weiterer 3 Isoenzyme der PKC, welche als δ -, ε - und ξ -Isoformen bezeichnet werden und unter der Gruppe B der Proteinkinasen zusammengefasst werden.^[83] Nachträglich wurde noch durch molekulares Klonen eine η -Isoform der Gruppe B hinzugefügt. Die Gruppe B Proteinkinasen benötigen, wenn sie zum Beispiel in COS-Zellen (SV40 transformierte Zelllinie) exprimiert werden, ebenfalls Phospholipid und DAG zur Aktivierung, jedoch kein Ca^{2+} .^[83] Die Aktivierung der PKC induziert die Phosphorylierung unterschiedlicher Proteine und verursacht dadurch eine Veränderung in diversen biologischen Systemen und kommt dadurch auch bei einer größeren Anzahl pathologischer Veränderungen vor. Darunter fallen zum Beispiel pathologische Zustände, wie der arterielle Hypertonus^[7], kardiale Hypertrophie^[53], Ischämie^[63] und Atherosklerose.^[68] Neben cAMP- und Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen, enthalten Endothelzellen auch PKC. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei einer Reihe von Signaltransduktionsvorgängen.^[81]

1.4.2 Bedeutung der PKC bei Diabetes mellitus:

Es gibt gut belegte Hinweise, dass die Erhöhung der DAG und konsekutive Aktivierung der PKC eine wichtige Ursache der diabetischen Gefäßveränderung ist.^[39,51] Die Glukose wird aus dem Blut in die Gefäßzellen über den GLUT₁-Transporter^[45] aufgenommen und dort in den Zellen zu mindestens 95 % über den Abbau durch Glykolyse und weniger als 5% über andere Mechanismen abgebaut. 1990 wurde erstmals entdeckt, dass eine hyperglykämische Umgebung zu einem Anstieg der DAG-Spiegel führte^[20] und damit ihrerseits die Proteinkinase C aktivieren kann. Hyperglykämie oder Diabetes-induzierte Erhöhungen der DAG- und PKC-Spiegel sind sowohl in einer Reihe von Zellkulturen als auch in Gefäß und Gewebepreparaten in verschiedenen Spezies gefunden worden,^[45,51] wie Tabelle 2 zeigt.

Tabelle 2

Zusammenfassung der PKC und DAG Veränderungen verschiedener Zellen

(in vitro) ^[51]	DAG	PKC
Endothelzellen der Retina	↑	↑
Endothelzellen der Aorta	↑	↑
glatte Muskulatur der Aorta	↑	↑
Mesangiumzellen	↑	↑
Gewebe		
Retina (diab. Ratten)	↑	↑
Herz (diab. Hunde und Ratten)	↑	↑
Aorta (diab. Ratten)	↑	↑
renale Glomerula (diab. Ratten)	↑	↑
Gehirn (diab. Ratten)	≈	≈
Granulationsgewebe	↑	↑

Weitergehende Studien haben gezeigt, dass diese DAG-Aktivierung höchstwahrscheinlich über die De novo-Synthese abläuft, da die DAG-Erhöhungen überwiegend in einem Palmitat-markierten DAG-Pool zu finden waren^[20] und diese in erster Linie die PKC β_2 -Isoform aktiviert.^[39,41]

Es wurde gezeigt, dass es schwierig ist, hyperglykämisch bedingte Veränderung der Gefäßzellen in den ursprünglichen Gefäßzustand wiederherzustellen.^[39]

Als Folgen einer PKC-Erhöhung werden unter anderem eine Aktivierung der zytosolischen oder Ca²⁺-sensitiven Phospholipase A₂ (cPLA₂), einer vermehrten Bildung von Prostaglandinen und einer Inhibition der Na⁺-K⁺-ATPase^[60,79] sowie der Stimulation einer Reihe von Wachstumshormonen und Cytokinen, wie zum Beispiel der c-fos-Exprimierung und Stimulation von Endothelin und Gefäß-Endothel-Wachstumsfaktor, genannt.^[80] Aufgrund dieser und anderer Mechanismen ist es nur verständlich, dass die PKC-Erhöhung ursächlich für viele Gefäßveränderungen wie Kontraktions- und Relaxationsveränderung, Permeabilitätsstörung, Basalmembranverdickung, Gerinnungsstörungen, Zellwachstum oder Neovaskularisation sein soll.

1.4.3 PKC β als besondere Isoform der Proteinkinase

Die Erforschung dieser Mechanismen führte zur Entwicklung von neuen Substanzen, die zeigen konnten, dass sie selektiv die Protein-Kinase C hemmen können. Der β -selektive Protein-Kinase-Hemmer LY333531 ist ein Inhibitor^[43], welcher schon an Gefäßen an der Niere^[40] und an der Retina diabetischer Ratten^[57] gezeigt hat, dass bestimmte diabetisch bedingte Veränderungen wiederhergestellt werden können. Der Protein-Kinase-Hemmer LY333531 hat am Auge des Schweines gezeigt, dass diabetische Neovaskularisationen im Auge verhindert werden können.^[21]

Weiterhin bestehen gut belegte Hinweise dafür, dass PKC Hemmer die NOS beeinflussen können.^[37,82,86]

Für Staurosporin, einem nicht selektiven Protein-Kinase C-Antagonisten, wurde die Steigerung der eNOS Aktivität gezeigt.^[82]

1.5 Fragestellung der Arbeit

Es gibt Hinweise, dass die Insulinresistenz mit sympatholytischen Substanzen positiv beeinflusst werden kann.^[22,54,62,96] Die Auswirkung derartiger Substanzen auf hyperglykämisch veränderte Gefäße ist zur Zeit noch nicht untersucht worden, so dass keine Aussagen über die lokale Wirkung solcher Substanzen unter einer hyperglykämischen Bedingung vorhanden sind.

Die Substanzen Clonidin und Moxonidin wirken sympatholytisch über einen α_2 - und Imidazolin-agonistischen Wirkmechanismus. Die sympatholytische Wirkung wird zentral erzielt, über die periphere Wirkung dieser Substanzen ist weniger bekannt.

Der Einsatz von Proteinkinase-Hemmern, wie zum Beispiel des β -selektiven Proteinkinase-Hemmers LY333531, könnten demnächst in der Indikation der Prophylaxe diabetischer Komplikationen zur Marktreife gelangen.^[21,40]

Mit dieser Substanz liegen ebenfalls keine Erfahrungen an hyperglykämisch veränderten Gefäßen vor.

Deshalb haben wir in einem etablierten invitro Relaxationsmodell eine hyperglykämische Gefäßschädigung nachgestellt und Veränderungen der Kontraktion und Relaxation von isolierten Aortenringen im Vergleich zur normoglykämischen Umgebung untersucht.

Weiterhin sollte der Einfluss von sowohl Imidazolininen als auch PKC-Hemmern auf Kontraktion und Relaxation untersucht werden.

Die Untersuchungen wurden in sowohl einem Versuchsaufbau von Aortenringen ohne weitere Gefäßkomplikationen, wie den isolierten Aortenringen des weissen Neuseeländischen Kaninchen als auch an pathologisch veränderten Gefäßen, wie den Aortenringen der spontan hypertensiven Ratte die zu Schlaganfällen neigt (SHSP), durchgeführt, jeweils unter normo- und hyperglykämischer Umgebung.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Labormaterial

Acetylcholin (Merck), Staurosporin (Merck),

Moxonidin (Lilly), LY333531 (Lilly),

L-Phenylephrin hydrochlorid (Sigma), Clonidin (Sigma),

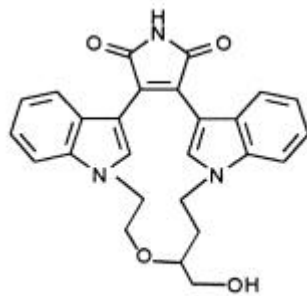
Ca-EDTA (Fluka Chemie, CH 9470), Sonstige Substanzen (Sigma)

Div. Scheren und Pinzetten (Aesculab Schulz und Sohn)

Kraftaufnehmer (Gould)+ Verstärker IMT Attenuator TF 83100

Mehrkanalschreiber (Watanabe)

Tabelle 3 -LY333531



(S)-13-[(Dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16,21 - dimetheno1H,13H-dibenzo (e, k) pyrrolo (3,4,-h) (1,4,13) oxadiazacyclohexadecen-1,3 (2H)-dion

2.2 Nährlösung:

Es wird eine modifizierte Krebs-Ringerlösung (10 Liter) erstellt, welche folgende

Substanzen enthält.	mM	mg/l	Gramm	MG
CaCl ₂ -Dihydrat	2,5	367	3,67	147,02
MgSO ₄ -Heptahydrat	1,2	295,8	2,958	246,47
NaCl	112	6550	65,5	58,44
KCL	5	373	3,73	74,56
NaHCO ₃	25	2100	21	84,01
KH ₂ PO ₄	1	136	1,36	136,09
L(+)-Ascorbat	0,284	50	0,5	176,13
Ca-Na ₂ -EDTA	0,026	9,69	0,0969	374,28
Die Lösung wird dann mit entweder				
Glukose	5,75	1139	11,39	198,2 oder
Glukose	46	9120	91,2	198,2 versetzt.

Die Lösungen werden auf zwei isolierten Organapparaturen je sechs Bäder verteilt, so dass die Apparatur mit modifizierter Krebs-Ringerlösung und 5,75 mM oder 46 mM Glukose gefüllt wird.

Jedes Organbad, mit einem Volumen von 20 ml, lässt sich unabhängig von anderen Organbädern regulieren. Die Organbäder werden auf 37 Grad Celsius erwärmt und mit 5% CO₂ und 95 % O₂ durchperl. Die Lösung hat jetzt einen pH von annähernd 7,4.

2.3 Versuchsaufbau isolierter Aortenringe

Aortenringe des Kaninchens

Linearer Kraftaufnehmer und Mehrkanalschreiber werden auf 5 Gramm = 49,05mN, die 10 cm graphischer Abbildung entsprechen vorjustiert. Ein Gramm entspricht einer Kraft von 9,81 mN. Die Aortenringe des Kaninchens werden nach dem Einhängen innerhalb 90 Minuten auf 5 Gramm vorgespannt und insgesamt 6 Stunden lang inkubiert. Die Inkubationszeit beinhaltet die Einhängszeit, so dass 6 Stunden Inkubation bedeuten: 90 Minuten Einhängszeit + 270 Minuten (4,5 h) Inkubation.

Die modifizierte Krebs-Ringerlösung wird während der Inkubation regelmäßig alle 60-90 Minuten ausgetauscht.

Aortenringe der Ratte

Die Mehrkanalschreiber werden bei der Verwendung von Aortenringen der SHSP-Ratten auf 2 Gramm = 19,62 mN, die 20 cm graphischer Abbildung entsprechen vorjustiert. Die Aortenringe werden innerhalb 60 min auf 19,62 mN vorgespannt und nun unterschiedlich lang inkubiert. Es werden 90 Minuten, 3 Stunden und 6 Stunden Inkubationszeit unterschieden, wobei die Inkubationszeit die Einhängszeit beinhaltet. 90 Minuten Inkubation bedeuten also 60 Minuten Einhängszeit und 30 Minuten eigentliche Inkubation.

Es wird der Einfluss der Inkubationszeit und Glukosebelastung auf das Gefäß untersucht.

Jeweils am Versuchstag werden alle Lösungen frisch angesetzt.

Acetylcholin wird 10^{-2} Molar eingewogen und in Aqua Bidest auf 10^{-6} M,

Phenylephrin wird 10^{-2} Molar eingewogen und in Aqua Bidest auf 10^{-4} M verdünnt. Die

Imidazoline werden mit eingewogen und mit Dimethylsulfoxid (DMSO) auf 10^{-2} M

gelöst. Staurosporin und LY333531 werden eingewogen und mit DMSO auf 10^{-3} M

gelöst. Die weiteren Verdünnungsschritte werden mit Aqua Bidest vorgenommen.

Versuchsbeginn:

Die Badgefäße werden mit 20 µl Phenylephrin versetzt, was bei einem Badinhalt von 20 ml einer Endkonzentration im Bad von 10^{-7} M Phenylephrin entspricht.

Nach 30 Minuten (Kaninchen) und 20 Minuten (Ratte), wenn die Kontraktion der Gefäße durch Phenylephrin ein Plateau erreicht haben, werden die Substanzen

Moxonidin und Clonidin und die Proteinkinase-Hemmer in die Badgefäße verabreicht.

Nachdem die Substanzen 15 Minuten inkubiert haben, wird alle 15 Minuten

Acetylcholin in steigender Konzentration zugesetzt von 3 nM (Kaninchen) und 1 nM (Ratte) bis 700 nM (Kaninchen) und 2000 mM (Ratte) Acetylcholin.

Wir sind von einem unspezifischen Abbau des Acetylcholins ausgegangen.

2.4 Tiere

Es werden sowohl männliche wie weibliche Neuseeländische Kaninchen verwendet, welche unter standardisierten Bedingungen gehalten werden. Die Tiere werden bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 % $\pm$ 10 %, bei 23 ± 1 Grad Celsius, einem Tag-Nacht-Zyklus von 12/12 h und einer Ernährung mit Tabs und Wasser ad libitum gehalten. Es werden Tiere verwendet im Gewichtsbereich von 1500 g bis 3020 g bei einem Mittelwert der Tiere von 2191 g und bei einer Standardabweichung von 467 g (n=49). Nachdem die Tiere mit einem Bolzenschussgerät getötet wurden, werden die Karotiden aufgeschnitten und das Tier entblutet.

Es werden nur weibliche SHSP Ratten verwendet.

Die Tiere werden bei einer Luftfeuchtigkeit von 60 % $\pm$ 10 %,

bei 23 ± 1 Grad Celsius, einem Tag-Nacht-Zyklus von 12/12 h und einer Ernährung mit Tabs und Wasser ad libitum gehalten

Eine mindestens 12 Wochen alte und höchstens 40 Wochen alte SHSP-Ratte wird gewogen und bei Mindestgewicht von 185 g verwendet. Der Mittelwert der Tiere liegt bei 201,5 Gramm mit 7,61 g (n=35) Standardabweichung

Der Blutdruck einer Stichprobe dieser Rattenpopulation betrug 170 ± 7 mmHg (n=10).

Nach einer CO₂-Anästhesie, werden die Karotiden aufgeschnitten und das Tier durch entbluten getötet. Die Haltung von Ratten, wie Kaninchen und deren Präparation halten sich an die Empfehlungen und Bestimmungen nationaler Tierschutzbestimmungen.

Präparation

Mit einer kleinen Schere wird die Haut des Tieres entfernt, mit einer Pinzette das Sternum gefasst und vorsichtig abgeschnitten. Mit einer größeren Schere wird der Bauchraum in Höhe des Zwerchfells eröffnet und am Rand der Rippen entfernt.

Nun wird von distal nach kranial der Brustkorb eröffnet, indem die Rippen im proximalen Drittel durchtrennt werden. Perikardiales Fettgewebe wird entfernt und der Brustkorb nach oben geklappt. Mit einer Pinzette und einer kleinen gebogenen Schere wird die Aorta thoracica vorsichtig aus ihrem Mesenterialbett präpariert. Die Aorta wird bei der Ratte in einer Länge von ca. 2,5 cm, beim Kaninchen in ca. 4 cm Länge herausgeschnitten und zügig in eine Krebs-Ringer-Lösung hineingelegt und eventuell vorhandenes Blut abgewaschen.

Von Beginn der Präparation bis zur Inkubation in einem Krebs-Ringer-Lösungsbad sollten nicht mehr als 90 Sekunden vergehen.

Anschließend werden bei der Ratte Aortenringe von 1 bis 1,5 mm Länge, beim Kaninchen 2-2,5 mm Länge präpariert. Diese werden vertikal in die Badgefäße eingehängt, indem sie zwischen einem festen und einen in der Höhe verstellbaren V₂A Draht eingespannt werden.

2.5 Auswertung und Ein- und Ausschlusskriterien

Nach dem Vorspannen werden die Schreiber in eine neutrale Position verstellt und die Mehrkanalschreiber bei einem Bandvorlauf von 30 cm / h gestartet.

Die maximale Kontraktion nach Phenylephrin, die Höhe der Kontraktion vor der jeweiligen Gabe von Acetylcholin und die dosisabhängige Relaxation für jede Konzentration werden bestimmt.

Die Höhe der Relaxation wird bezogen auf die Stärke der Kontraktion vor der ersten Acetylcholingabe. Aortenringe, die bei $3 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin nicht mehr als 25 % relaxieren werden aus dem Versuch ausgeschlossen. Werden mehr als 1/3 der Ringe ausgeschlossen, wird der ganze Versuchstag verworfen.

Von der relativen Relaxationskurve wird das Integral (AUC [*area under the curve*]) berechnet, indem die Fläche zwischen der Kurve der relativen Relaxation und der negativen logarithmierten Acetylcholinkonzentration bestimmt wird.

2.6 Statistik

Die Daten werden mit einem t-Test , im Falle einer Nichtstandardverteilung einem Mann Whitney Rang Summen Test sowie bei Vergleich mehrerer Relaxationskurven einem ANOVA , im Falle einer Nichtstandardverteilung mit einem Kruskal-Wallis One Way ANOVA auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Die Untersuchungen erfolgen mit Hilfe von Sigmastat (Jandelsoft Scientific Software, San Rafael CA), wobei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wird. Für eine grafische Darstellung werden die Daten in Sigmaplot (Jandelsoft Scientific Software, San Rafael CA) formatiert.

Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt, wenn es nicht anders gekennzeichnet ist. Die Anzahl n der Versuche ergibt sich aus Anzahl der Ringe aus einem isolierten Badversuch und Tiere, so soll zum Beispiel $n = 14$ (4) anzeigen, dass 14 Aortenringe von 4 Tieren verwendet wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Glukose auf Kontraktion und Relaxation von Aortenringen des Kaninchens

3.1.1 Einfluss von Glukose auf die Kontraktion

Die Stimulation der Aortenringe vom Neuseeländischen Kaninchen mit 10^{-7} M Phenylephrin führt nach Vorspannung der Ringe auf 49,05 mN und 6 Stunden Inkubation zu einer Kontraktion von $35,71 \pm 2,64$ mN bei 5,75 mM (n=125), $35,71 \pm 2,84$ mN bei 11,5 mM (n=13) und $34,35 \pm 1,86$ mN bei 46 mM Glukose (n=127).

Abbildung 1

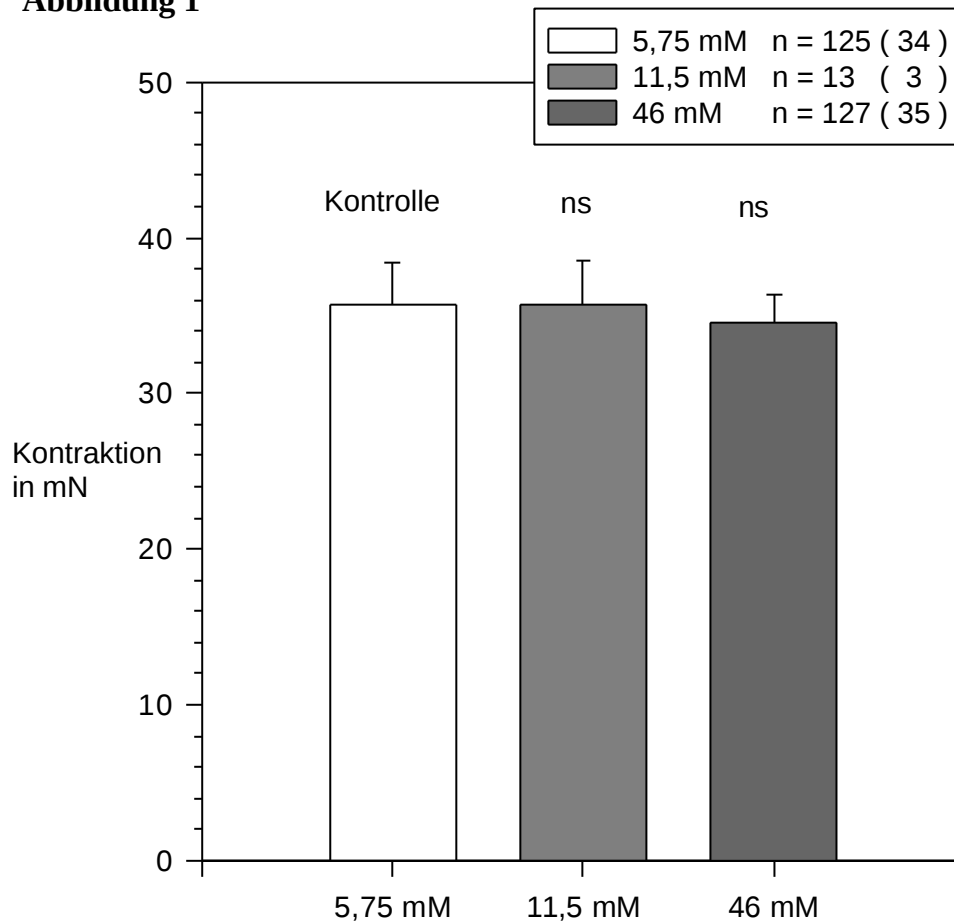


Abbildung 1

Die Wirkung von Glukose auf die Kontraktion von Aortenringen des Kaninchens nach Gabe von 10^{-7} M Phenylephrin. Die Kontraktion ist unabhängig von der Glukosekonzentration bei einer Inkubationszeit von 6 Stunden. (ns = $p > 0,05$)

Die Kontraktion auf Phenylephrin unterscheidet sich in den einzelnen Gruppen nicht. Bei einem Vergleich der verschiedenen Gruppen lässt sich kein Unterschied nachweisen.

Die Kontraktionen stabilisieren sich auf einem Plateau in Höhe von $31,20 \pm 2,06$ mN bei 5,75 mM (n=125), $33,53 \pm 2,84$ mN bei 11,5 mM (n=13) und $32,47 \pm 1,56$ mN (n=127) bei 46 mM Glukose. Zwischen den Gruppen 5,75 mM, 11,5 mM und 46 mM Glukose bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Stärke der Kontraktion. Die Stimulation mit Phenylephrin führt zu einer schnell einsetzenden Kontraktion, die jedoch im Zeitverlauf leicht abnimmt und dabei ein Plateau erreicht.

3.1.2 Einfluss von Glukose auf die Relaxation durch Acetylcholin

30 Minuten nach Kontraktion mit Phenylephrin werden die Aortenringe mit Acetylcholin in steigender Konzentration versetzt. Acetylcholin wirkt in einem Konzentrationsbereich von ca. $3 \cdot 10^{-9}$ bis ca. $2 \cdot 10^{-7}$ M relaxierend. Ab einer Konzentration von $7 \cdot 10^{-7}$ M ist der relaxierende Einfluss von Acetylcholin eingeschränkt. Dieser Effekt ist sowohl in 5,75 mM, 11,5 mM inkubierten Aortenringen als auch in 46 mM Glukose inkubierten Aortenringen zu sehen. Bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin beträgt die acetylcholinbedingte Relaxation $64 \% \pm 3 \%$ (n=23) bei 5,75 mM Glukose, $60 \% \pm 6 \%$ bei 11,5 mM (n=16) und $57 \% \pm 3 \%$ bei 46 mM Glukose (n=21).

Abbildung 2

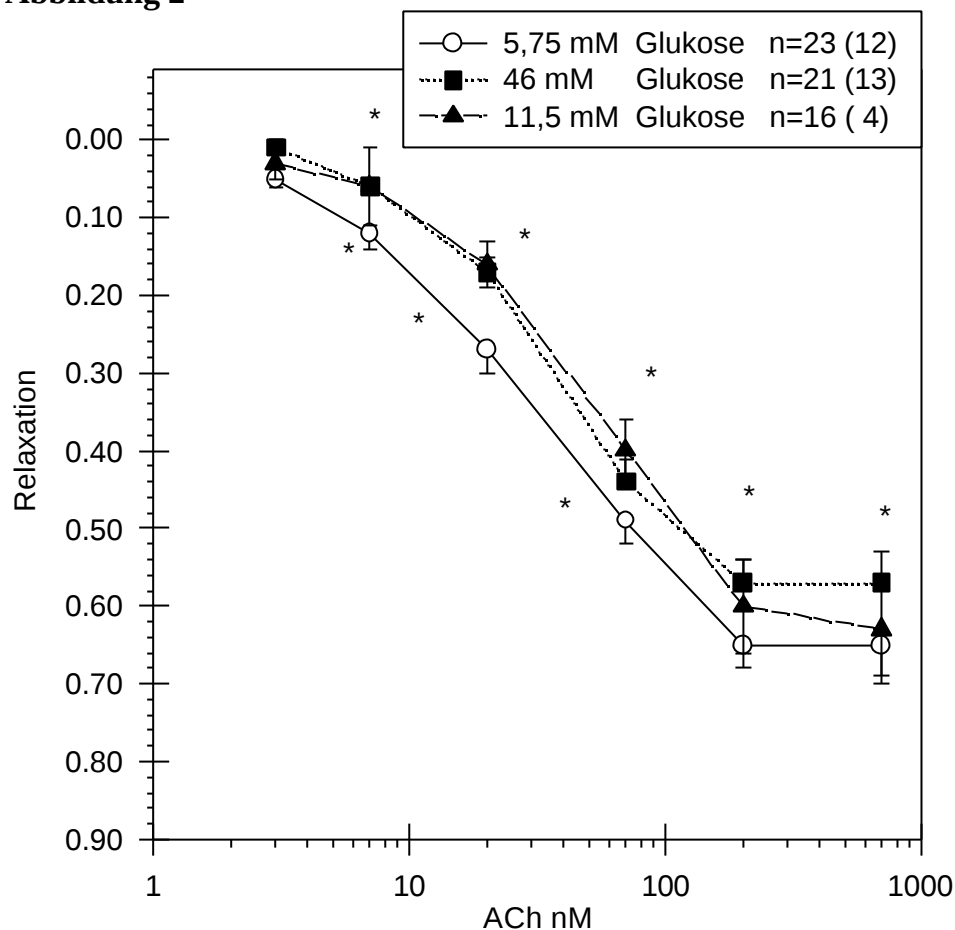


Abbildung 2

Einfluss von Glukose auf Aortenringe des Kaninchens auf die Relaxation durch Acetylcholin. Die Relaxation auf einzelne Acetylcholingaben ist in den Glukosekonzentrationen 11,5 und 46 mM im Vergleich zur 5,75 mM Glukosekontrolle vermindert. (entspricht $p < 0,05$). Ein statistischer Unterschied in der Relaxation unter 11,5 und 46 mM Glukose besteht nicht.*

Die größte Relaxation ist in den Konzentrationen von $2 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin und $7 \cdot 10^{-7}$ M zu sehen. Unter 5,75 mM Glukose zeigen 8 von 16 (50 %) Aortenringen eine maximale Relaxation bei $2 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin bei 46 mM Glukose sind 12 von 29 (41%) Aortenringen maximal relaxiert.

Die Aortenringe, die sowohl in 46 mM Glukose als auch in 5,75 mM oder 11,5 mM Glukose inkubiert wurden, sind in Ihrer Fähigkeit zu relaxieren gemindert.

Die maximale Relaxation bei 5,75 mM, 11,5 mM und bei 46 mM Glukose liegt bei 61 % . Dies entspricht einer Einschränkung von 39 % gegenüber einer vollständigen Relaxation. Die Gabe von mindestens $7 \cdot 10^{-9}$ M Acetylcholin führt zu einer Relaxation mit anschließender Kontraktion. Wir haben eine Acetylcholingabenserie untersucht, indem ein Integral (area under the curve (AUC)) dieser Relaxationskurve und dem negativen Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration die relative Relaxation nach jeder einzelnen Acetylcholingabe gebildet wurde. Das Integral der 5,75 mM Relaxationskurve ist gegenüber dem Integral der 46 mM Glukose Relaxationskurve statistisch signifikant vergrößert, ebenso ist das Integral der 5,75 mM Relaxationskurve statistisch signifikant gegenüber dem Integral der 11,5 mM Glukose Relaxationskurve vergrößert. Das Integral der Glukoserelaxationskurven von 46 mM und 11,5 mM unterscheiden sich statistisch nicht.

Abbildung 3

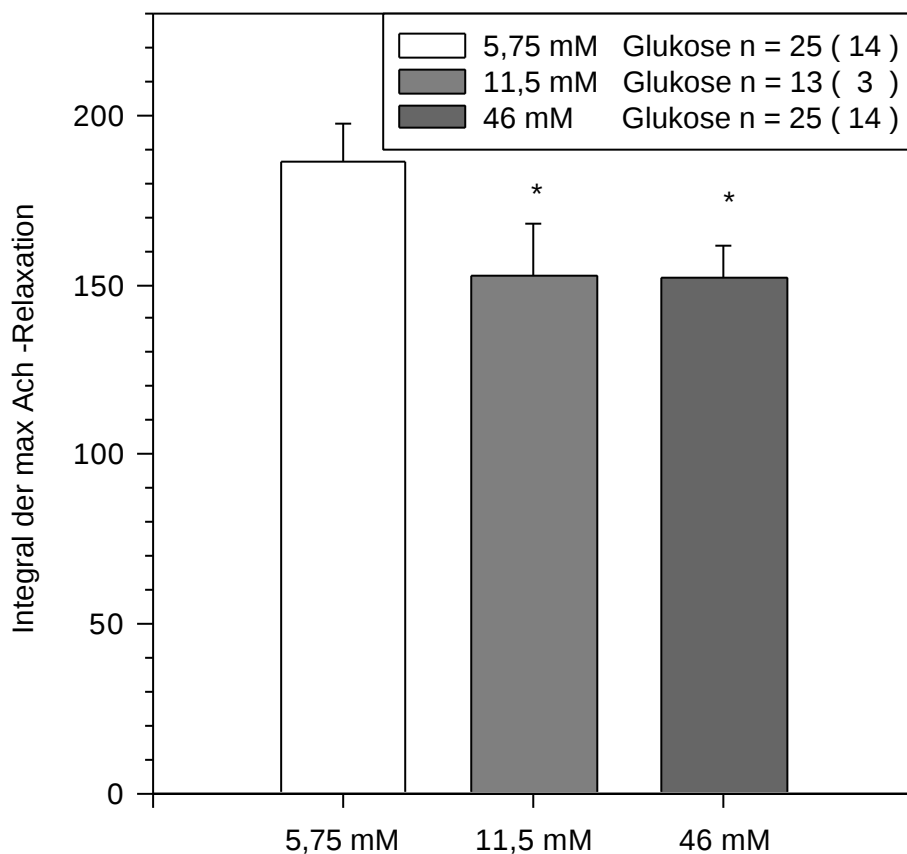


Abbildung 3

Auswirkung der acetylcholin-bedingten Relaxation auf das Integral der maximalen Relaxation. Glukosebelastung vermindert die Relaxationsfähigkeit von Aorten-ringen des Kaninchens. Das Integral der Relaxationskurven ist signifikant vermindert.

3.2 Einfluss von Imidazolinen auf Relaxation

Eigenwirkung von Moxonidin auf den Aortenring

Um die Wirkung von Imidazolinen auf die Relaxation beschreiben zu können, wird die direkte Wirkung der jeweiligen Gabe gesondert betrachtet. Moxonidin wirkt in Konzentrationen von 10^{-8} M relaxierend auf die Aortenringe. Die Relaxationen liegen bei $8 \% \pm 3 \%$ unter 5,75 mM Glukose (n=15) und $8 \% \pm 5 \%$ unter 46 mM Glukose (n=15). Die Relaxation setzt langsam ein und bleibt bestehen. Bei der Gabe von 10^{-7} M Moxonidin ist der Einfluss auf das Gefäß am geringsten. Ab 10^{-6} M Moxonidin nimmt ein kontrahierender Einfluss stark zu. Die Kontraktionen der Aortenringe liegt $36 \% \pm 5 \%$ für 5,75 mM (n=16) und $29 \% \pm 6 \%$ für 46 mM Glukose (n=15). Die Kontraktionen sind in den Konzentrationen 10^{-6} und 10^{-7} M Moxonidin statistisch signifikant vermindert. Die Aortenringe kontrahieren bei 10^{-6} M Moxonidin und stabilisieren sich so auf einem Niveau, welches etwa 2/3 unter dem Maximum liegt. Bei der Gabe von 10^{-7} M Moxonidin erfolgt eine geringe Kontraktion von $2 \% \pm 1 \%$ (n=17) gegenüber einer Relaxation von $3 \% \pm 1 \%$ bei 46 mM Glukose (n=17). Diese Kontraktion setzt schnell ein, hält jedoch nicht lange an. Glukosebelastung verändert nicht die Gefäßwirkung nach Gabe von 10^{-8} M Moxonidin.

Abbildung 4

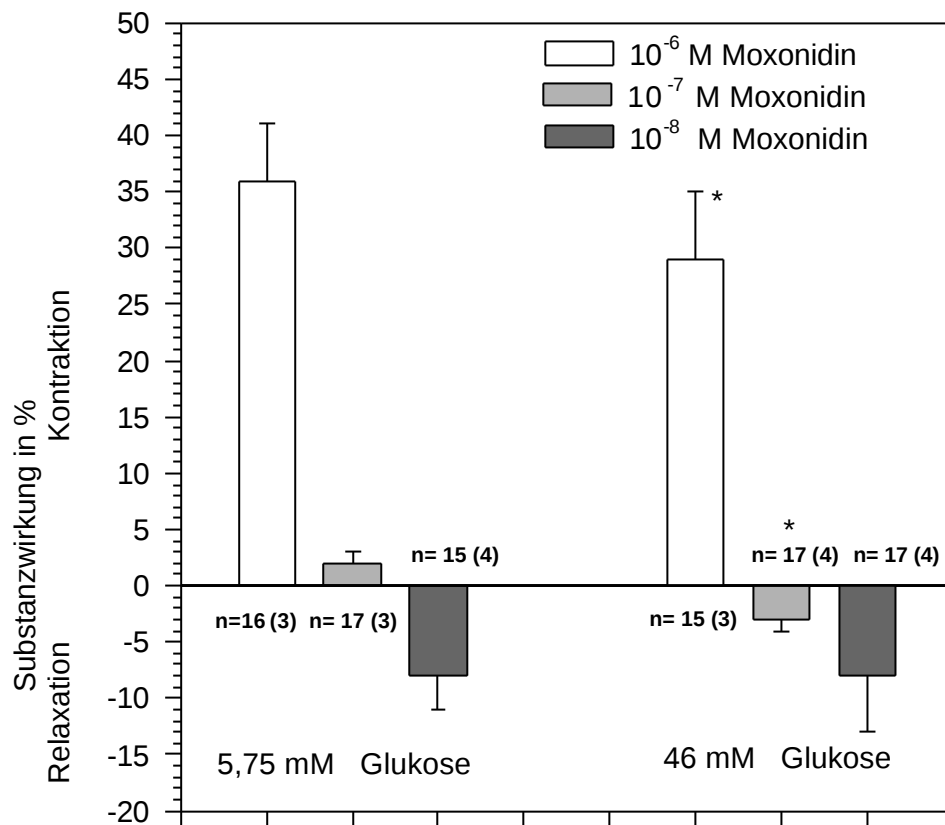


Abbildung 4

Direkte Gefäßwirkung von Moxonidin an Aortenringen des Kaninchens.
 Glukosebelastung vermindert die Kontraktion nach Substanzgabe in den
 Konzentrationen 10^{-6} und 10^{-7} M Moxonidin. (* entspricht $p < 0,05$)

Eigenwirkung von Clonidin auf den Aortenring

Clonidin wirkt in Konzentrationen von 10^{-8} leicht kontrahierend auf die Aortenringe. Die Kontraktionen liegen bei $2 \% \pm 4 \%$ für 5,75 mM Glukose (n=15) und $2 \% \pm 2 \%$ für 46 mM Glukose (n=14). Die Kontraktion setzt schnell ein, bleibt aber nicht lange bestehen. In dieser Konzentration ist der Einfluss auf das Gefäß am geringsten. Unter 10^{-7} M Clonidin ist der Einfluss auf das Gefäß am größten, hier beträgt die Kontraktion $18 \% \pm 5 \%$ (n=15) bei 5,75 mM Glukose und $6 \% \pm 6 \%$ bei 46 mM Glukose (n=26). In dieser Konzentration bewirkt die Glukosebelastung mit 46 mM Glukose eine Verminderung der Kontraktion.

In der Konzentration von 10^{-6} M Clonidin nimmt der kontrahierende Einfluss wieder ab. Die Kontraktion der Aortenringe liegt $11 \% \pm 9 \%$ für 5,75 mM (n=15) und $7 \% \pm 10 \%$ für 46 mM Glukose (n=13). Die Kontraktion der Ringe, die in 46 mM Glukose inkubiert wurden, ist statistisch signifikant nur in der Konzentration von 10^{-7} M Clonidin vermindert.

In der Konzentration von 10^{-7} M Clonidin ist die Kontraktion unter 46 mM Glukose mit $6 \% \pm 6 \%$ (n=26) gegenüber der 5,75 mM Glukosekontrolle mit $18 \% \pm 5 \%$ (n=15) vermindert.

Diese Kontraktion setzt schnell ein, hält jedoch nicht lange an.

Die Aortenringe kontrahieren bei 10^{-6} M Clonidin und stabilisieren sich so auf einem Niveau, welches etwa 50 % unter dem Maximum dieser Kontraktion liegt.

Abbildung 5

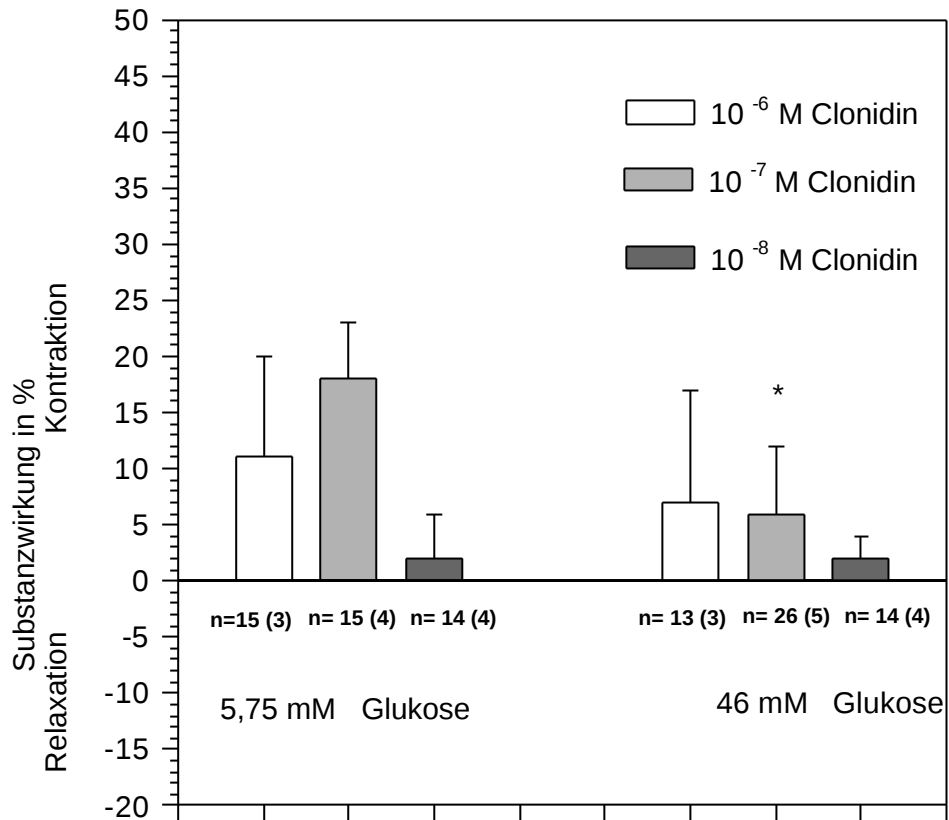


Abbildung 5

Direkte Gefäßwirkung von Clonidin an Aortenringen des Kaninchens.

Unter 46 mM Glukose ist die Kontraktion durch die Gabe von 10^{-7} M Clonidin vermindert. (entspricht $p < 0,05$)*

Wirkung von Moxonidin auf die Relaxation durch Acetylcholin

Moxonidin führt in der Konzentration von 10^{-6} M zu einer Abnahme der Relaxation durch Acetylcholin, inkubiert in 5,75 mM Glukose. Das Integral der Moxonidinrelaxationskurve liegt mit $133,07 \pm 19,06$ (n=16) unter dem Integral der 5,75 mM Glukosekontrolle und ist statistisch signifikant kleiner. Bei einer Gabe von 10^{-6} M Moxonidin unter 46 mM Glukose ist die Relaxation gegenüber der entsprechenden Glukosekontrolle nicht eingeschränkt (Abbildung 9). Das Integral der Moxonidinrelaxationskurve unter 46 mM Glukosebelastung unterscheidet sich mit $148,02 \pm 15,85$ (n=15) statistisch nicht von der 46 mM Glukosekontrolle mit $152,18 \pm 9,59$ (n=21). Die Relaxation der Aortenringe durch Acetylcholin ist auf $54\% \pm 7\%$ unter 5,75 mM und $57\% \pm 7\%$ unter 46 mM Glukose vermindert. Im Vergleich zur 5,75 mM Glukosekontrolle führt die Gabe von 10^{-7} M Moxonidin zu einer Relaxation, welche sich statistisch nicht von der Kontrolle unterscheidet (Abbildung 7).

Das Integral der Moxonidinrelaxationskurve unterscheidet sich mit $189,12 \pm 32,85$ (n=17) nicht gegenüber dem Integral der 5,75 mM Kontrolle mit $186,11 \pm 11,73$ (n=23). Bei Gabe von 10^{-7} M Moxonidin unter 46 mM Glukose ist die Relaxation gegenüber der Glukosekontrolle nicht eingeschränkt (Abbildung 10). Das Integral der Moxonidinrelaxationskurve mit $147,27 \pm 14,82$ (n=17) unterscheidet sich nicht von der Glukosekontrolle (Abbildung 13). Die Relaxation der Aortenringe beträgt $66\% \pm 7\%$ (n=17) unter 5,75 mM Glukose, und ist unter 46 mM Glukose auf $55\% \pm 6\%$ (n=17) vermindert. Nach Gabe von 10^{-8} M Moxonidin unter 5,75 mM Glukose ist die Relaxation gegenüber der Kontrolle eingeschränkt (Abbildung 8). 10^{-8} M Moxonidin unter 5,75 mM Glukose verringert das Integral der Relaxationskurve auf $147,07 \pm 28,40$ (n=15) und führt einer statistisch signifikanten Abweichungen zur 5,75 mM Glukosekontrolle (Abbildung 12). Die Moxonidingabe bei 46 mM Glukose unterscheidet sich nicht von der entsprechenden Glukosekontrolle.

Abbildung 6

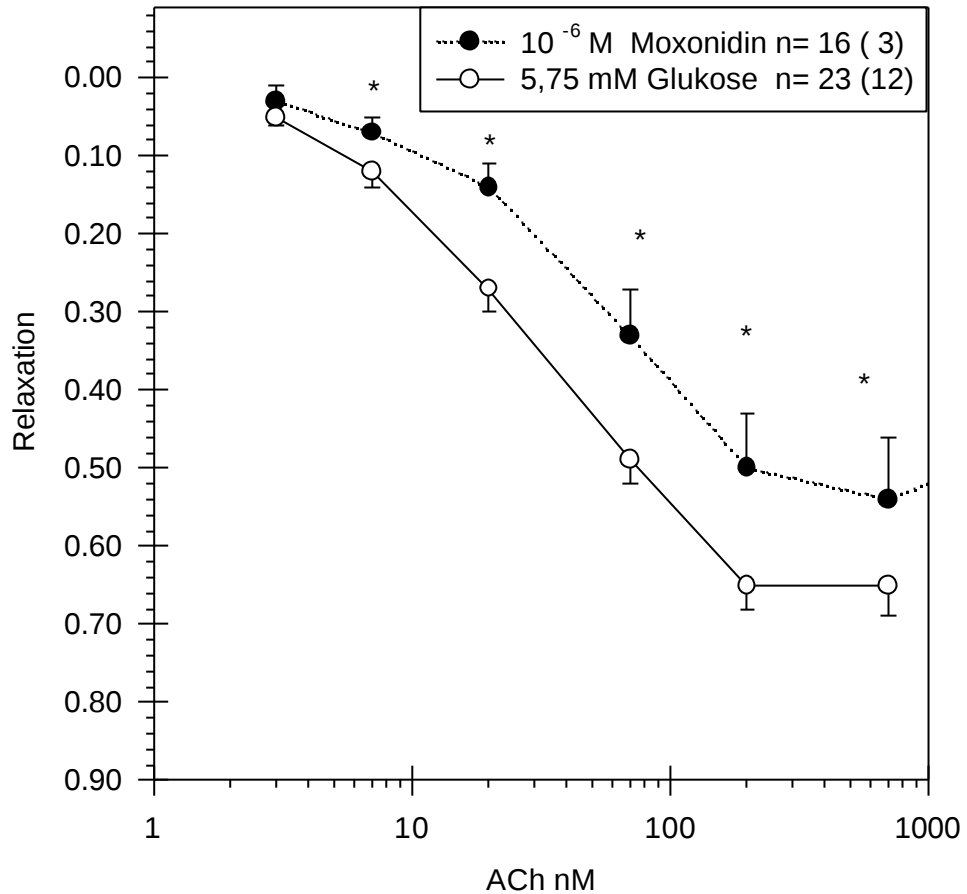


Abbildung 6

Aortenringe des Kaninchens sind für 6 Stunden in 5,75 mM Glukose inkubiert worden. Moxonidin zeigt in der Konzentration von 10^{-6} M eine statistisch signifikante Relaxationsminderung gegenüber der acetylcholinbedingten Relaxation unter 5,75 mM Glukose. (*entspricht $p < 0,05$).

Abbildung 7

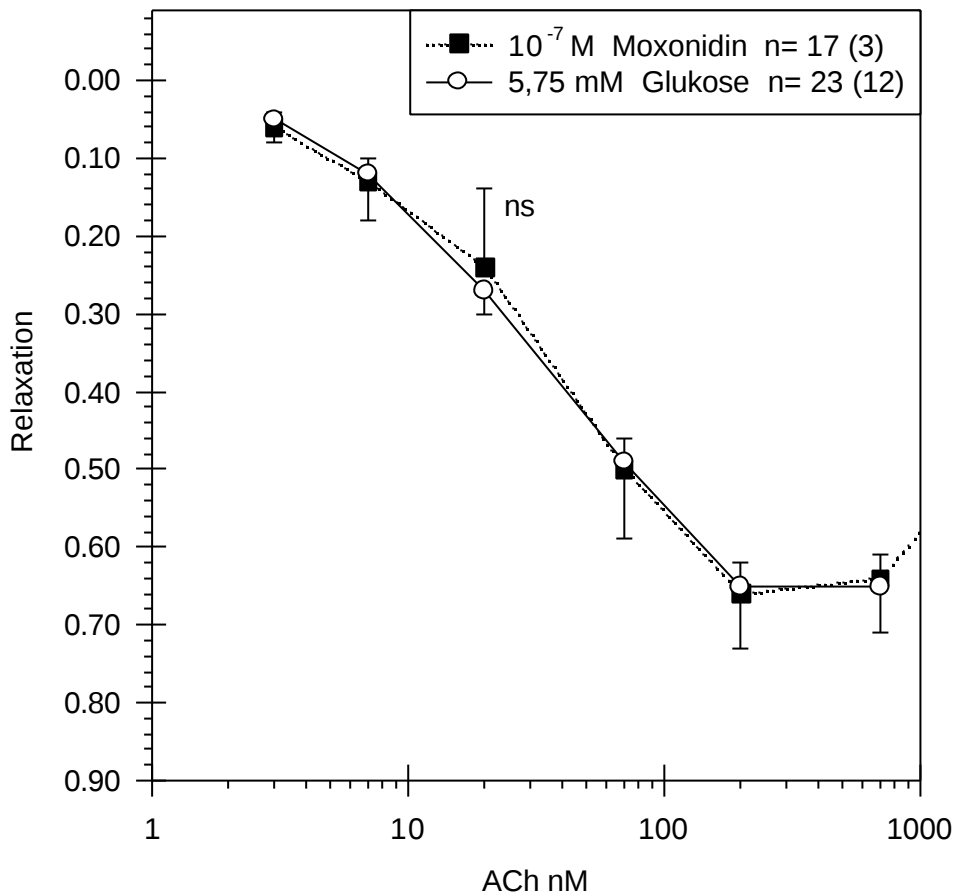


Abbildung 7

10⁻⁷ M Moxonidin zeigt keine Auswirkung auf 6 Stunden in 5,75 mM Glukose inkubierten Aortenringe des Kaninchens. Die Relaxation durch Acetylcholin ist nicht eingeschränkt. (ns = p>0,05).

Abbildung 8

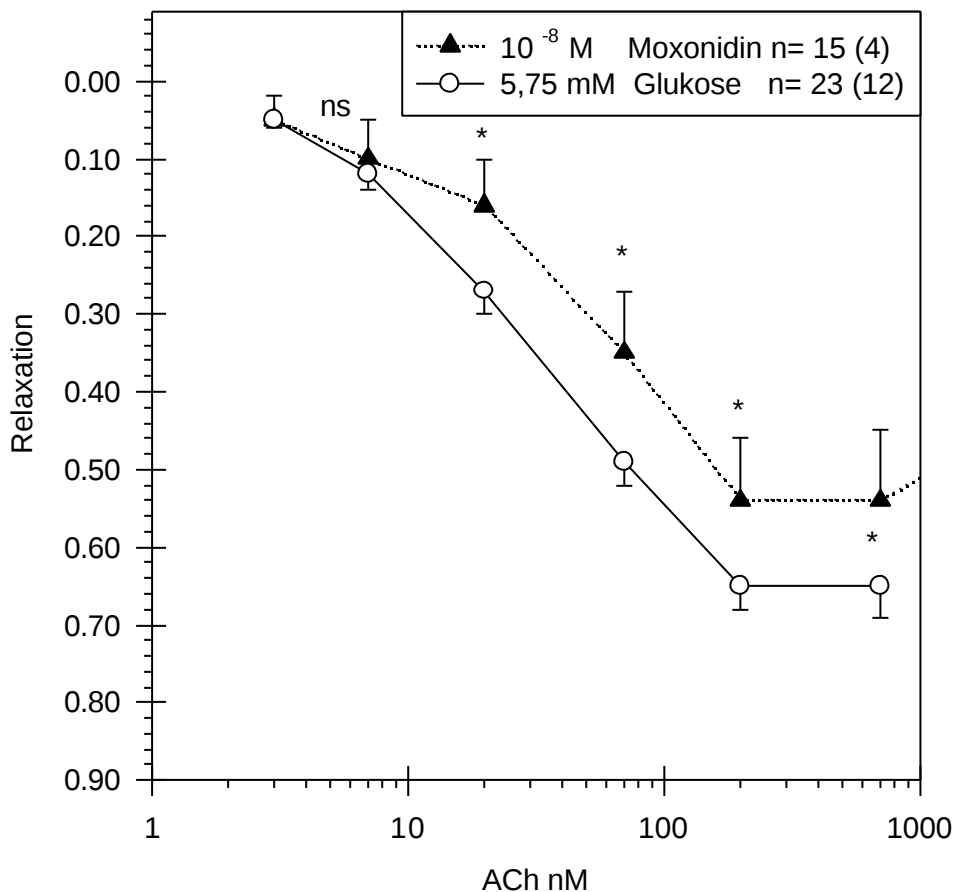


Abbildung 8

10⁻⁸ M Moxonidin führt zu einer Einschränkung der acetylcholin-bedingten Relaxation des Aortenringes des Kaninchens unter 5,75 mM Glukose und 6 Stunden Inkubation. (p<0,05).*

Abbildung 9

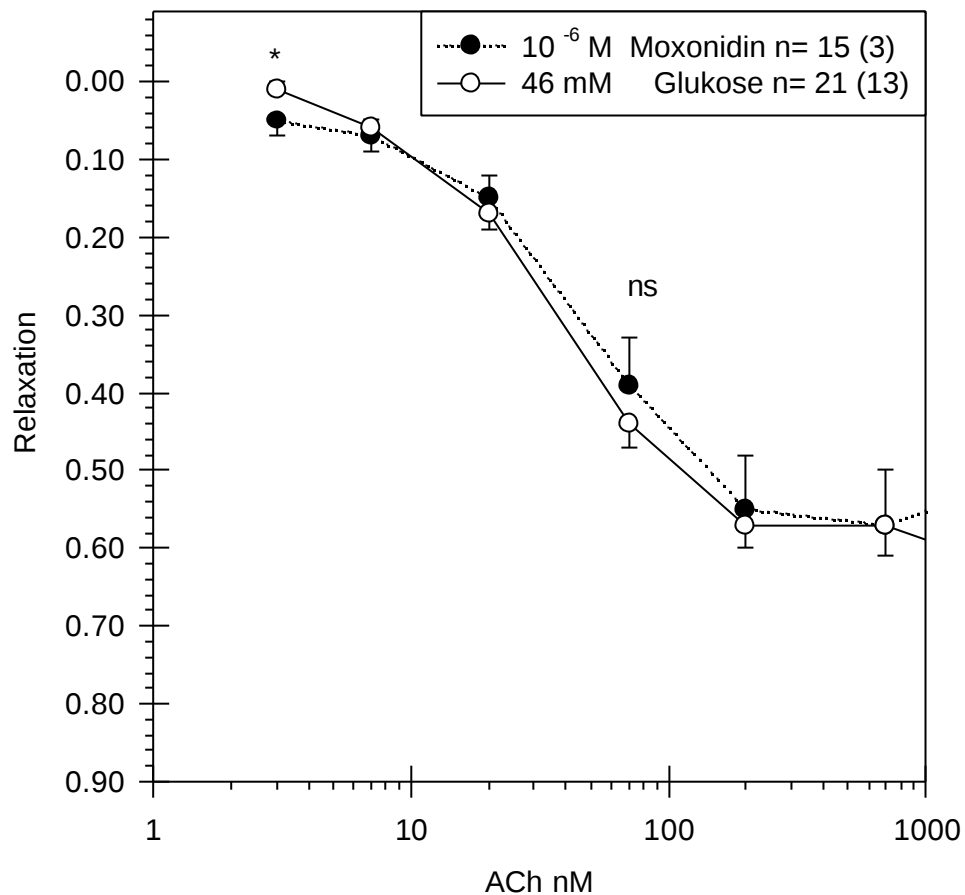


Abbildung 9

Aortenringe des Kaninchens sind für 6 Stunden in 46 mM Glukose inkubiert worden. Die Relaxation durch Acetylcholin ist durch die Gabe von 10⁻⁶ M Moxonidin im Vergleich zur 46 mM Glukose-Kontrolle nicht verändert.

(*entspricht $p < 0,05$)

Abbildung 10

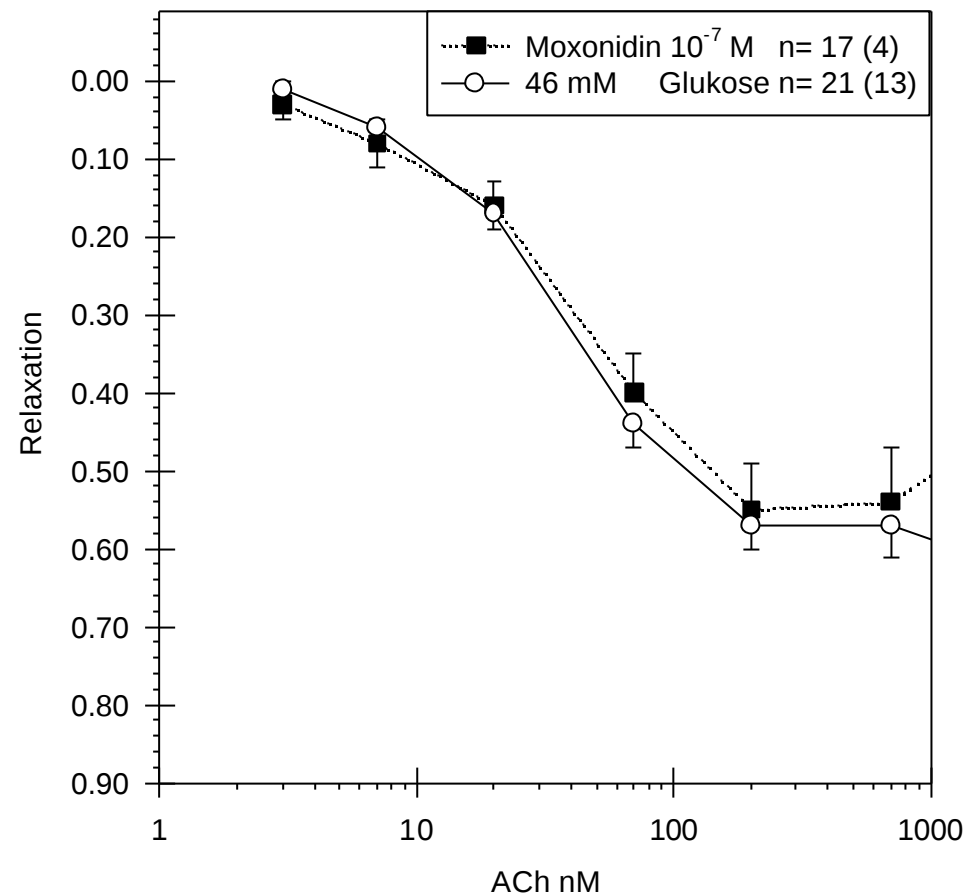


Abbildung 10 und 11
Acetylcholin-
bedingte
Relaxation von
Aortenringen
des Kaninchens
nach 6 Stunden
Inkubation in
46 mM
Glukose. Die
Gaben von 10^{-7}
und 10^{-8} M
Moxonidin
führen zu
keiner
Relaxations-
einschränkung
durch
Acetylcholin im
Vergleich zur
46 mM
Glukose-
kontrolle.
(* entspricht
 $p < 0,05$)

Abbildung 11

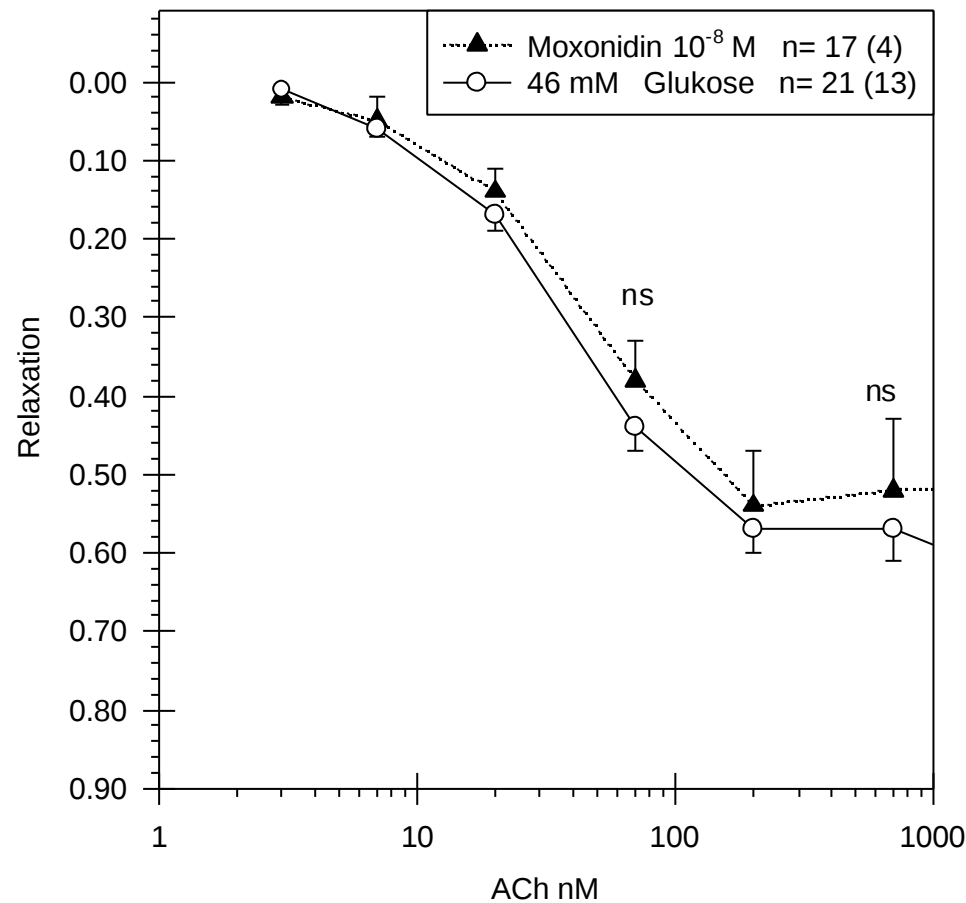


Abbildung 12

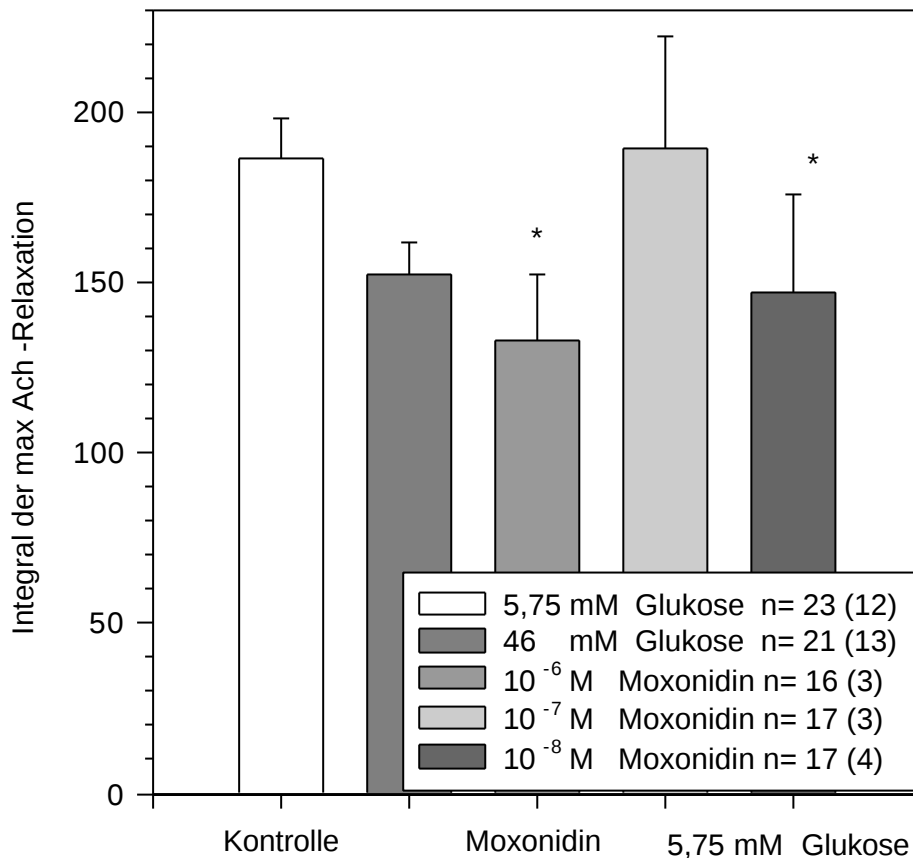


Abbildung 12 zeigt die Integrale von Relaxationskurven unter 5,75 mM Glukose. 10^{-6} und 10^{-8} M Moxonidin bewirken eine Relaxationsminderung der acetylcholin-abhängigen Relaxation an Aortenringen des Kaninchens.

Abbildung 13

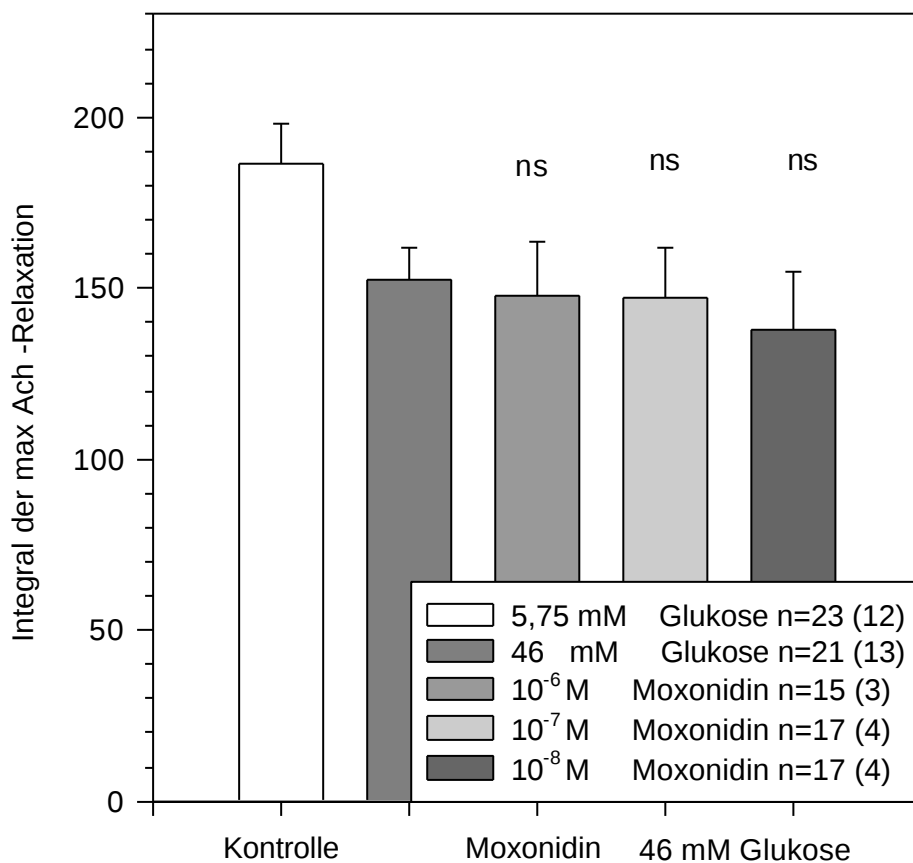


Abbildung 13 zeigt die Integrale von Relaxationskurven unter 46 mM Glukose. Die Gabe von Moxonidin in den Konzentrationen 10^{-8} bis 10^{-6} M führt zu keiner Einschränkung der acetylcholin-bedingten Relaxation. (ns = $p > 0,05$)

Wirkung von Clonidin auf die Relaxation durch Acetylcholin

Clonidin führt in der Konzentration von 10^{-6} M zu einer Verminderung der durch Acetylcholin hervorgerufenen Relaxation (Abbildung 14). Das Integral der Clonidinrelaxationskurve liegt mit $131,05 \pm 29,36$ ($n=15$) statistisch signifikant unter dem Integral der 5,75 mM Kontrolle (Abbildung 20). Im Vergleich dazu unterscheidet sich die Relaxationskurve unter Glukosebelastung mit $148,26 \pm 39,54$ ($n=13$) nicht von der 46 mM Kontrolle. Die Relaxation der Aortenringe durch Acetylcholin ist unter 5,75 mM auf $52 \% \pm 10 \%$ ($n=15$), unter 46 mM Glukose auf $55 \% \pm 11 \%$ ($n=13$) eingeschränkt. Ein Unterschied zwischen den beiden Glukosekontrollen besteht statistisch nicht.

Unter 5,75 mM Glukose ist die Relaxation nach Gabe von 10^{-7} M Clonidin gegenüber der entsprechenden Glukosekontrolle eingeschränkt (Abbildung 15). Im Gegensatz zur Gabe von 10^{-7} M Clonidin unter 46 mM Glukosebelastung bei der die Relaxation gegenüber der Glukosekontrolle unverändert ist (Abbildung 18). Das Integral der Clonidinrelaxationskurve unterscheidet sich mit $139,79 \pm 34,12$ ($n=15$) nicht von dem Integral der Clonidinrelaxationskurve unter 46 mM Glukosebelastung mit $150,47 \pm 22,46$ ($n=26$). Die maximale Relaxation besteht bei 10^{-7} M Clonidin bei $63 \% \pm 6 \%$ ($n=15$) unter 5,75 mM Glukose und $62 \% \pm 8 \%$ ($n=26$) unter 46 mM Glukose.

Bei einer Gabe von 10^{-8} M Clonidin bestehen vereinzelt Relaxationsminderungen durch die Clonidingabe (Abbildung 16). Das Integral der Clonidinrelaxationskurve unterscheidet sich jedoch mit $168,42 \pm 18,54$ ($n=15$) nicht von der Clonidinrelaxationskurve unter 46 mM Glukosebelastung mit $181,43 \pm 30,23$ ($n=14$). In der Auswertung als Integral zeigt sich in der Kurve unter 5,75 mM Glukose keine Relaxationsminderung, in der Kurve unter 46 mM Glukosebelastung eine Verminderung der Relaxationseinschränkung (Abbildung 20). Die maximale Relaxation besteht bei 10^{-8} M Clonidin bei $60 \% \pm 6 \%$ ($n=15$) unter 5,75 mM Glukose und $65 \% \pm 10 \%$ ($n=14$) unter 46 mM Glukose.

Abbildung 14

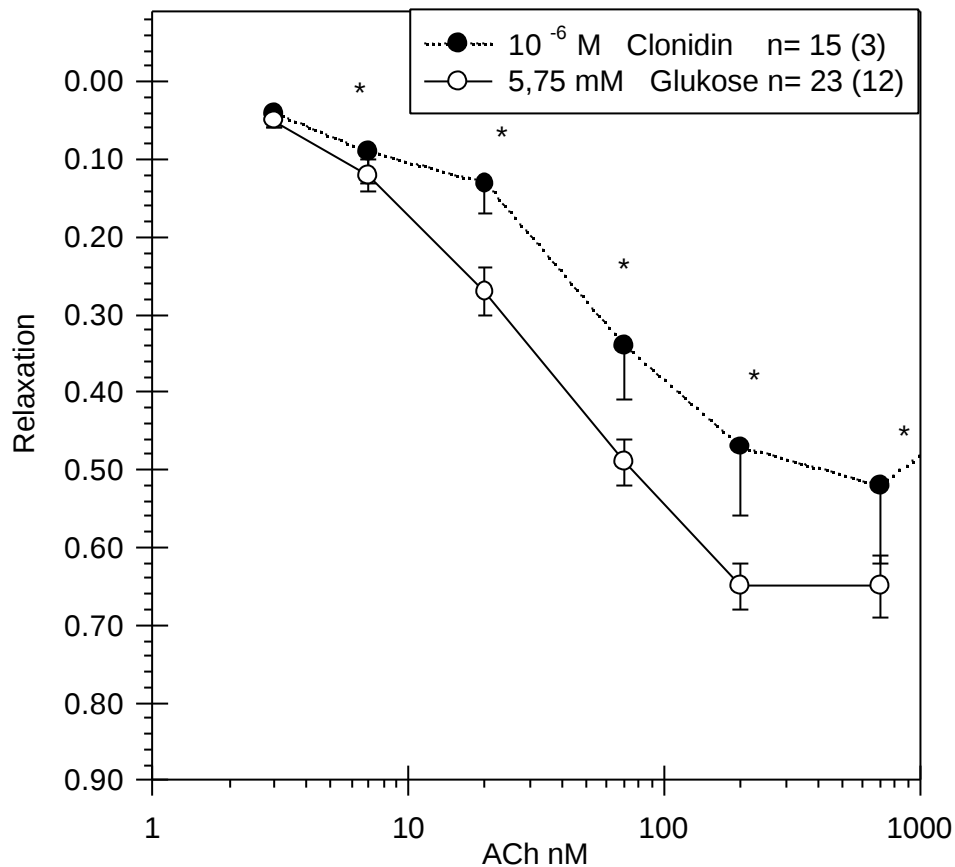
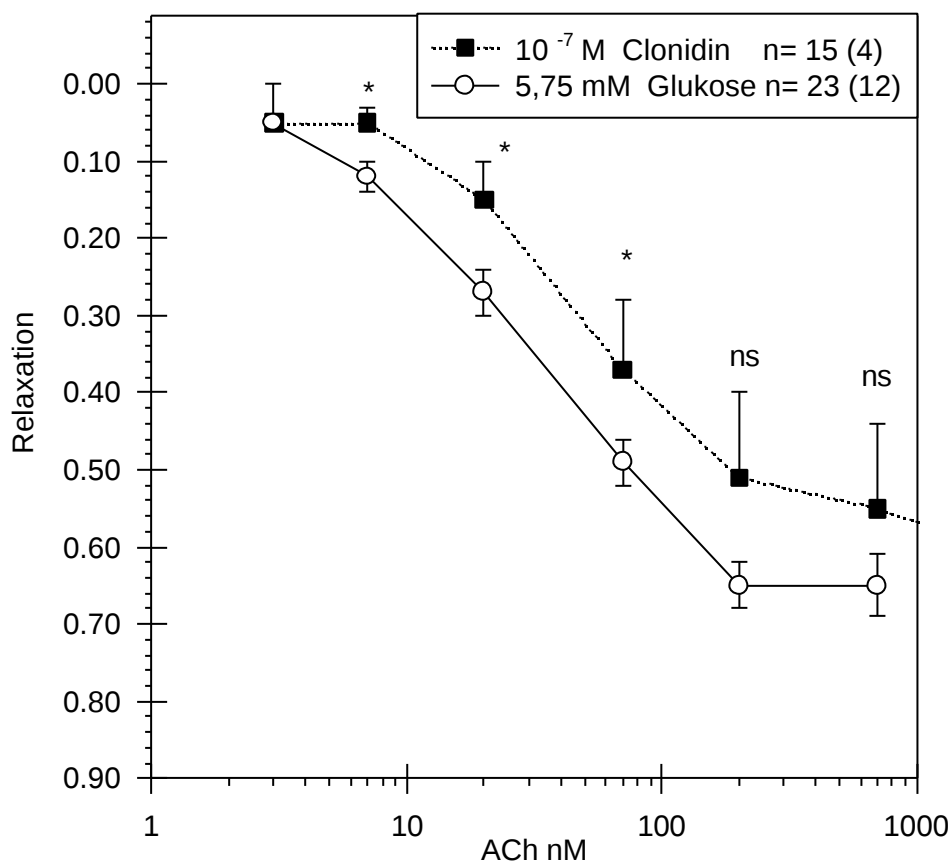


Abbildung 14
und 15 zeigen
die Relaxation
von
Aortenringen
des Kaninchens
durch
Acetylcholin
unter dem
Einfluss von
Clonidin in den
Konzentrationen
von 10⁻⁶ M und
10⁻⁷ M unter
5,75 mM

Abbildung 15



Glukose. Die
Relaxation der
Aortenringe ist
durch die Gabe
von Clonidin
vermindert,
b. w. teilweise
vermindert.
(* entspricht
 $p < 0,05$)

Abbildung 16

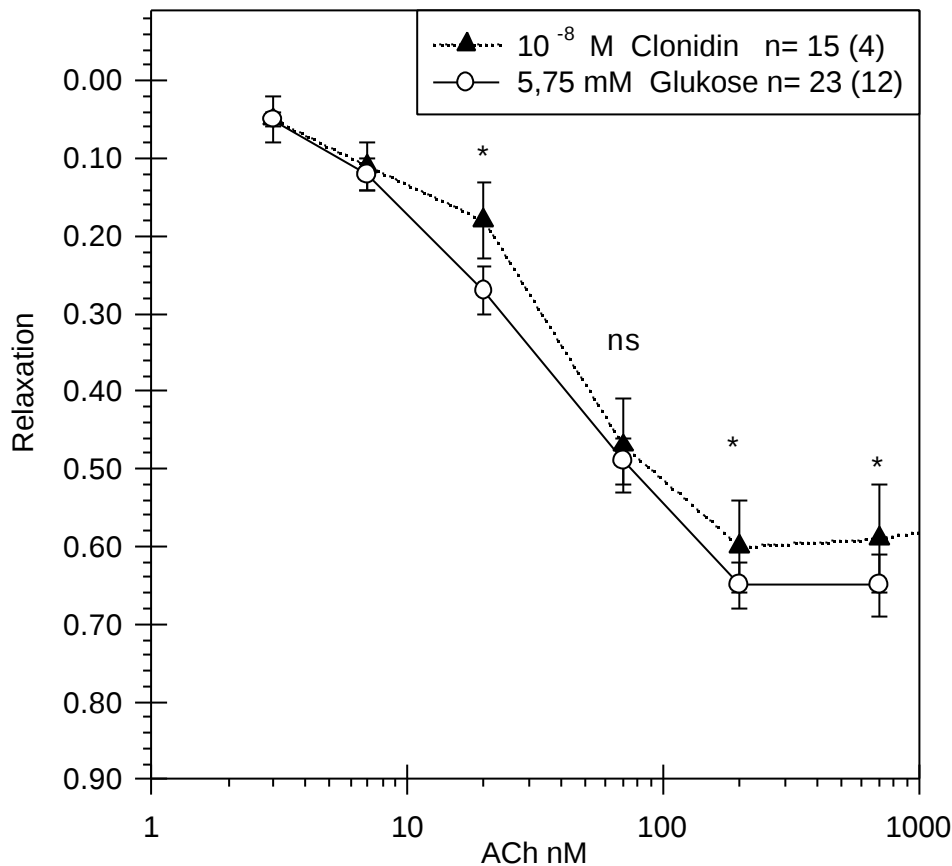


Abbildung 16 zeigt die Relaxation von Aortenringen des Kaninchens durch Acetylcholin unter dem Einfluss von 10^{-8} M Clonidin. Die Relaxation der Aortenringe ist teilweise vermindert. (*entspricht $p < 0,05$)

Abbildung 17

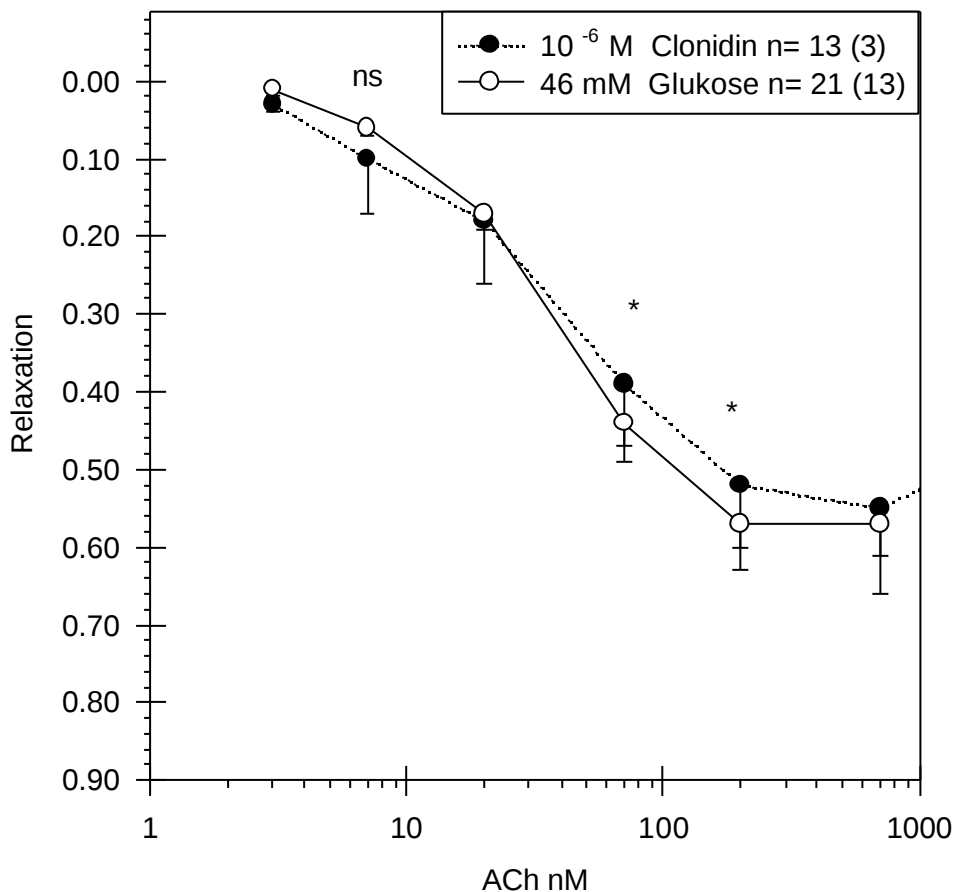


Abbildung 17 zeigt die Relaxation von Aortenringen des Kaninchens durch Acetylcholin unter dem Einfluss von 10^{-6} M Clonidin unter 46 mM Glukose. Die Relaxation der Aortenringe ist teilweise vermindert. (* $p < 0,05$)

Abbildung 18

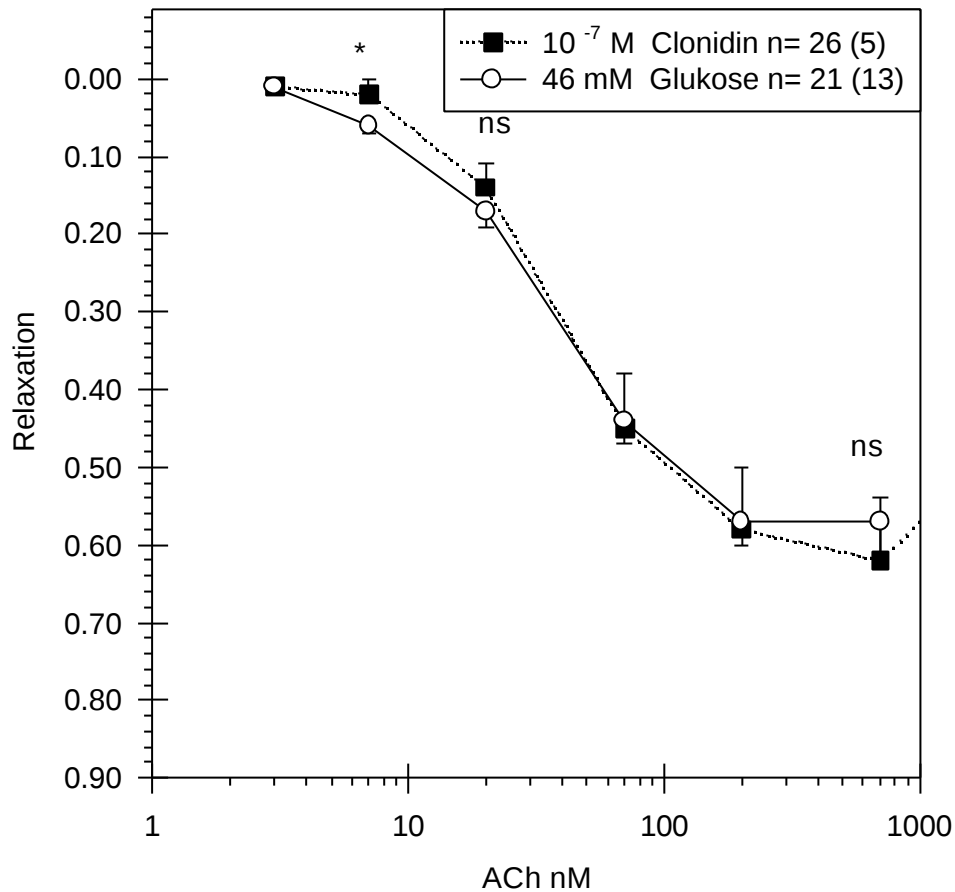


Abbildung 18 und

19

Aortenringe des Kaninchens sind für 6 Stunden in 46 mM Glukose inkubiert worden. Die Relaxation durch Acetylcholin ist durch die Gabe von Clonidin nicht verändert. Clonidin hat in

Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-8} M bis auf einzelne

Ausnahmen statistisch keinen Einfluss auf die so vorgeschädigten Aortenringe.

(ns entspricht $p > 0,05$).

Abbildung 19

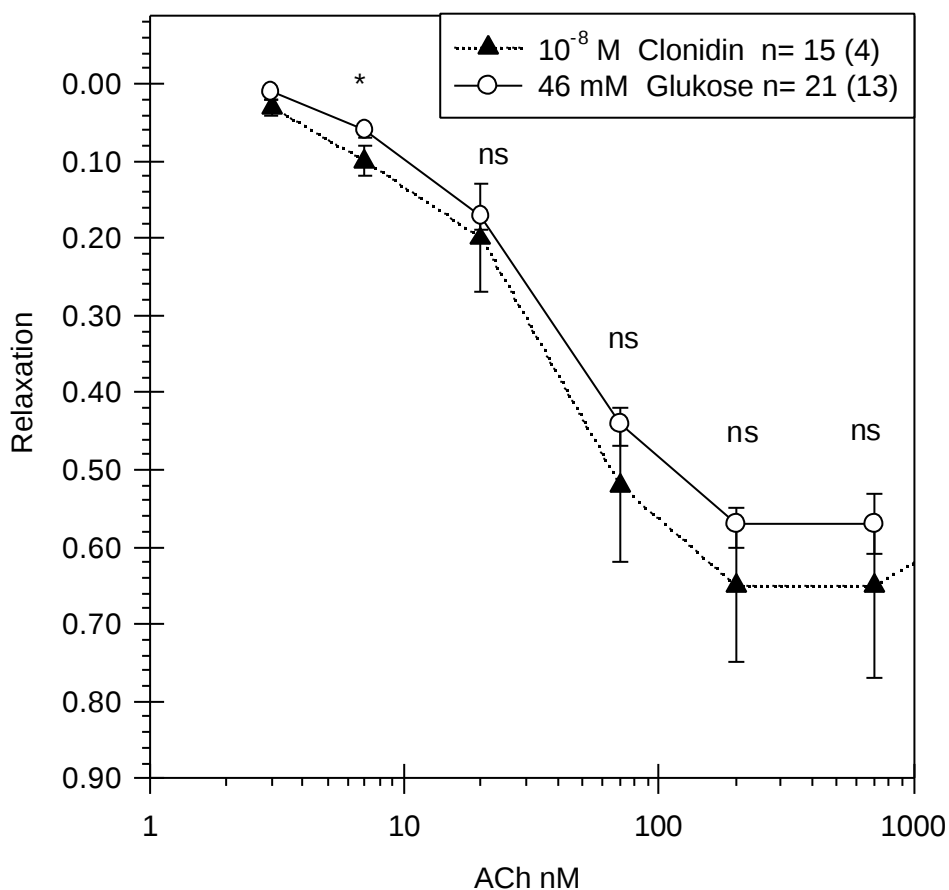
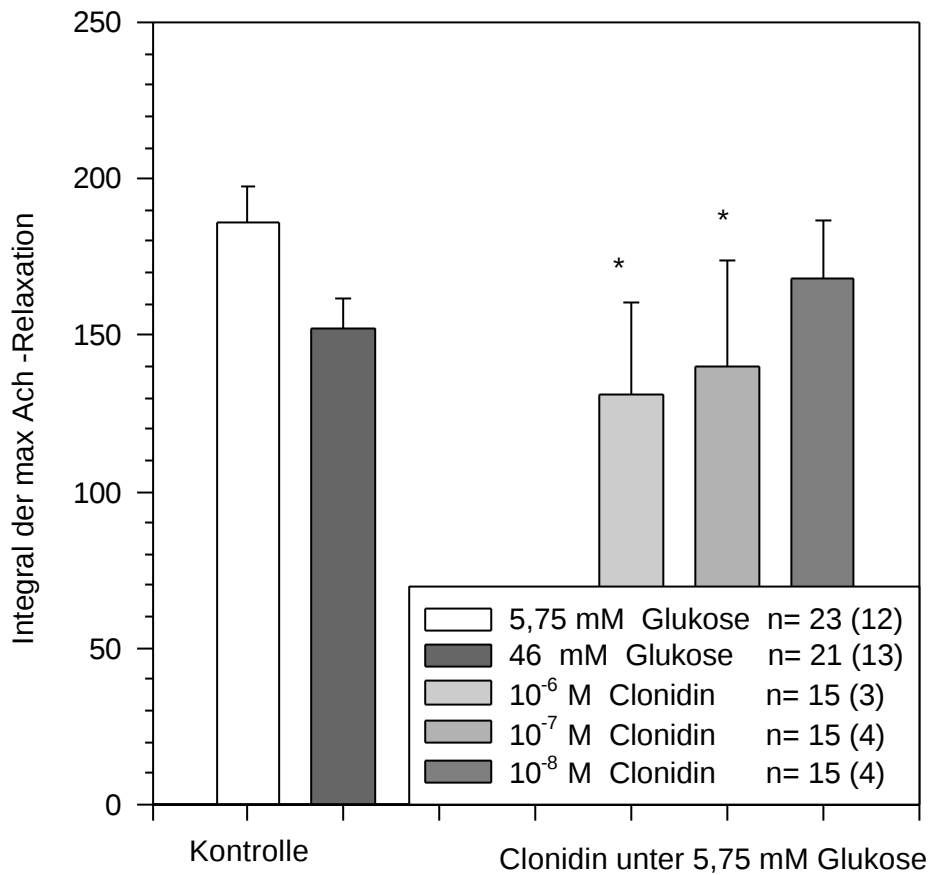


Abbildung 20



Abbildungen 20 bis 21

zeigen die Integrale verschiedener Relaxationskurven an Aortenringen des Kaninchens. Eine Einschränkung der Relaxation besteht in Konzentrationen von 10^{-6} und 10^{-7} M Clonidin im Vergleich zur 5,75 mM Kontrolle (Abb. 20).

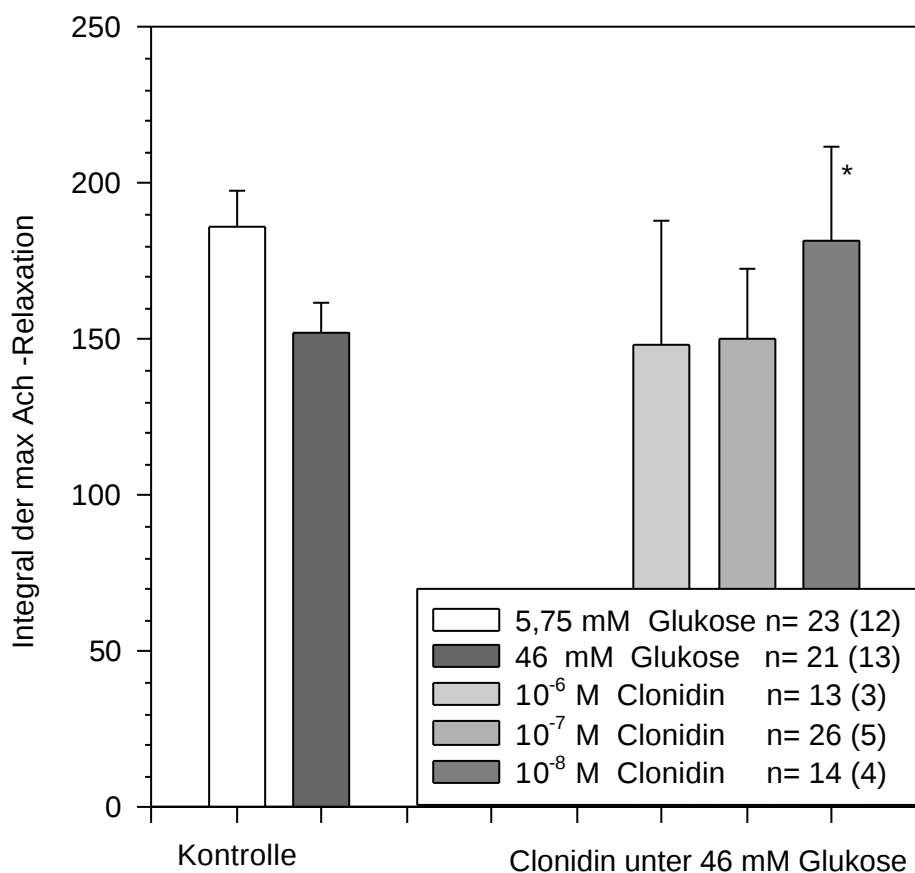
Clonidin kann die eingeschränkte Relaxation durch

Glukose in der Konzentration von 10^{-8} M Clonidin wiederherstellen

(Abb. 21). In den anderen Konzentrationen ist die Relaxation gegenüber der 46mM Glukose Kontrolle nicht eingeschränkt.

(* entspricht $p < 0,05$)

Abbildung 21



3.3 Einfluss von Staurosporin auf die Relaxation

10^{-7} M Staurosporin relaxiert isolierte Aortenringe des Kaninchens.

In einigen Ringen traten anfangs geringe Kontraktionen auf, die jedoch schnell abnahmen. Die acetylcholinbedingte Relaxation ist deutlich verstärkt.

Die Relaxationseinschränkung durch die Glukosebelastung wird vollständig aufgehoben.

Die Relaxationskurven der acetylcholinbedingten Relaxation durch Staurosporin unterscheiden sich unter normo- wie hyperglykämischen Bedingungen nicht.

Abbildung 22

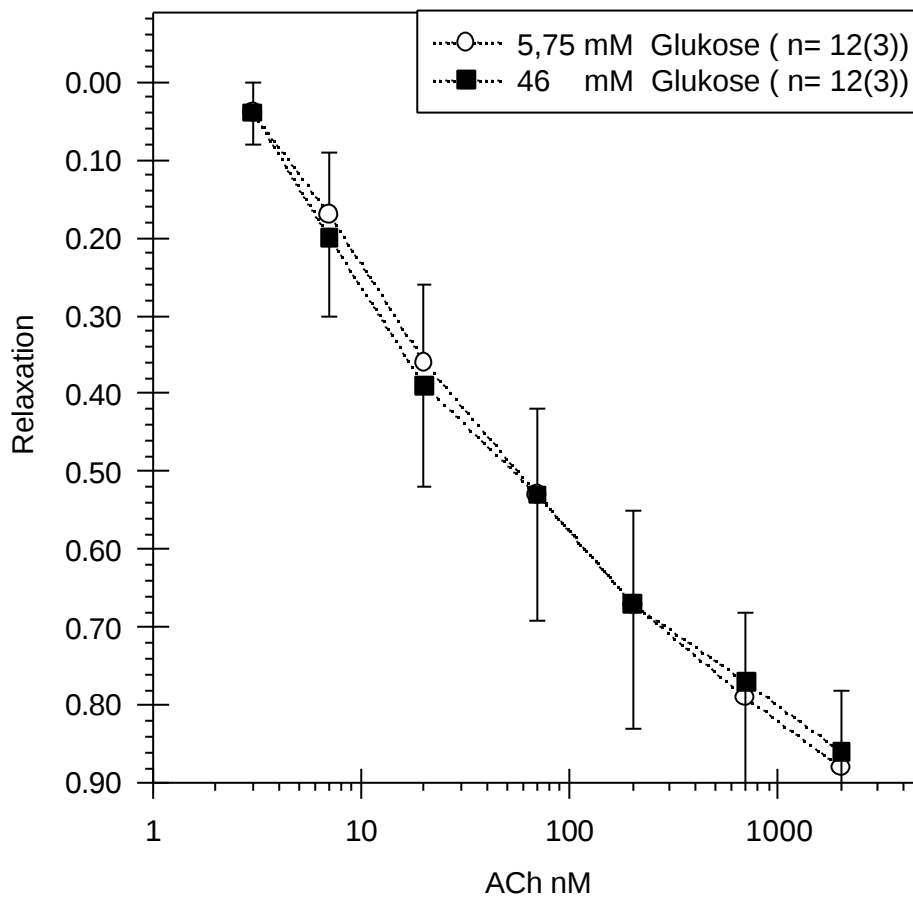


Abbildung 22 zeigt den Relaxationsverlauf von Aortenringen Kaninchens nach Gabe von 100 nM Staurosporin bei vorheriger Kontraktion mit 100 nM Phenylephrin. Die acetylcholinbedingte Relaxation unter 5,75 mM und 46 mM Glukose unterscheidet sich nicht.

3.4 Einfluss von Glukose auf Kontraktion und Relaxation von Aortenringen der SHSP-Ratte

Einfluss von Glukose und Inkubationszeit auf die Kontraktion durch Phenylephrin

Die Kontraktion der Aortenringe der SHSP Ratte mit 10^{-7} Phenylephrin führt zu einer schnell einsetzenden Kontraktion und hat einen Umfang von minimal $5,10 \pm 1,67$ mN unter 5,75 mM Glukose und 1,5 Stunden Inkubation (n=14) bis maximal $9,02 \pm 2,45$ mN unter 46 mM Glukose und 3 Stunden Inkubation (n=40). Die Aortenringe stabilisieren sich nach der Kontraktion auf einem Plateau in einem Umfang von minimal 71,4 % der Maximalkontraktion bei 3 Stunden Inkubation und 5,75 mM Glukose bis maximal 100 % der Maximalkontraktion bei 1,5 Stunden und 46 mM Glukose.

Einfluss von Inkubationszeit auf die Kontraktion durch Phenylephrin

Unter 5,75 mM Glukose kontrahieren die Aortenringe bei 3 Stunden Inkubationszeit mit $6,18 \pm 1,57$ mN (n=10) statistisch signifikant stärker als die Ringe mit $5,30 \pm 0,98$ mN (n=14) nach 1,5 Stunden Inkubation. Nach 6 Stunden Inkubationszeit fallen die Kontraktionen mit $6,87 \pm 1,47$ mN (n=13) im Vergleich zu 1,5 Stunden inkubierten Aortenringen unverändert aus. Nach Bildung eines Plateaus unterscheidet sich die Kontraktionskraft der Aortenringe bei weder 3 Stunden noch 6 Stunden im Vergleich zu 1,5 Stunden Inkubationszeit.

Unter Glukosebelastung mit 46 mM Glukose fallen die Kontraktionen nach 3 Stunden Inkubationszeit mit $8,93 \pm 2,45$ mN (n=40) signifikant stärker aus, als die Kontraktion der Ringe nach 1,5 Stunden Inkubation mit $5,59 \pm 1,18$ mN (n=14). Die Kontraktion nach 6 Stunden Inkubationszeit ist mit $6,47 \pm 2,55$ mN (n=14) im Vergleich zur Kontraktion der Aortenringe nach 1,5 Stunden Inkubation unverändert, ein Zusammenhang besteht nicht. Nach Bildung eines Plateaus unterscheiden sich die 3 Stunden inkubierten Ringe mit $6,97 \pm 3,53$ mN (n=40) statistisch signifikant von denen nach 1,5 Stunden Inkubationszeit mit $4,22 \pm 1,96$ mN (n=14), nicht jedoch die Aortenringe bei 6 Stunden und 1,5 Stunden Inkubationszeit.

Einfluss von Glukose auf die Kontraktion durch Phenylephrin

Innerhalb der Inkubationszeit von 1,5 Stunden unterscheiden sich die in verschiedenen Glukosekonzentrationen inkubierten Ringe nicht in der Maximalkontraktion, jedoch statistisch signifikant im Plateau, welches sie nach der Kontraktion erreichen. Das Plateau der 46 mM inkubierten Aortenringe liegt mit $5,59 \pm 2,06$ mN (n=15) höher als das der 5,75 mM inkubierten Ringe mit $4,22 \pm 1,96$ mN (n=15).

Abbildung 23

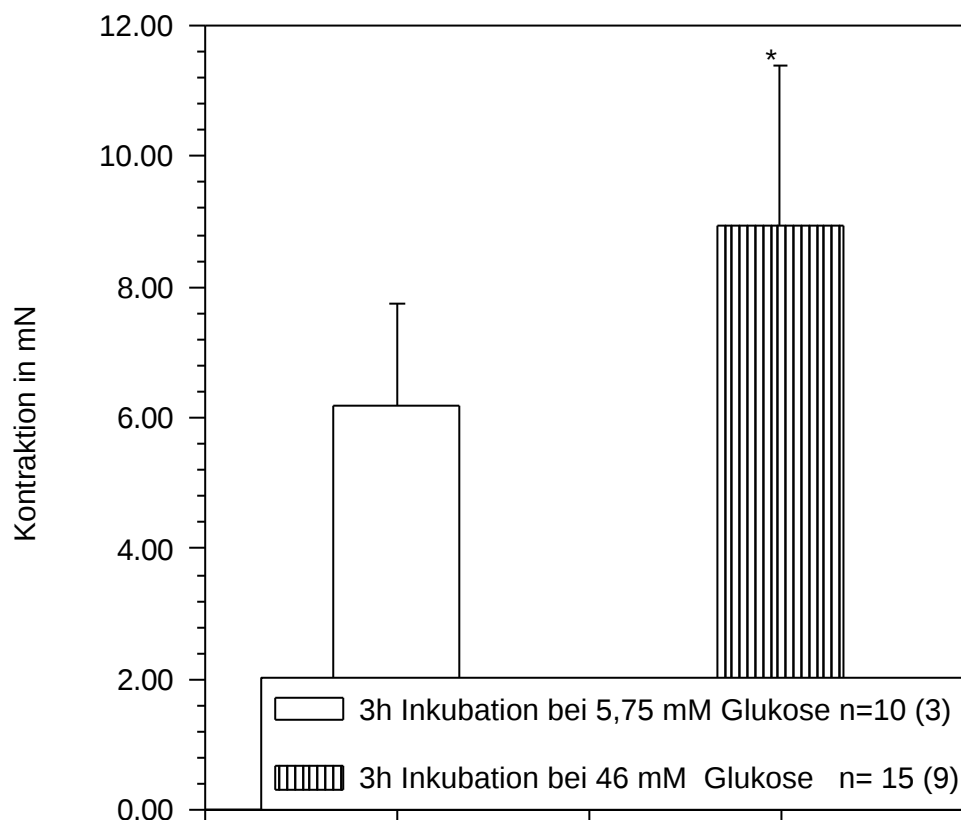


Abbildung 23

*Einfluss von Inkubationszeit unter 46 mM Glukose auf die Kontraktion von Aortenringen der Ratte. Nach 3 Stunden Inkubation in 46 mM Glukose ist die Kontraktion verstärkt. (* $p < 0,05$)*

Nach 3 Stunden Inkubation kontrahieren die Ringe der SHSP-Ratte unter Glukosebelastung mit $8,93 \pm 2,45$ mN (n=40) stärker, als die unter 5,75 mM Glukose inkubierten Ringe mit $6,18 \pm 1,57$ mN (n=10). Die Kontraktion stabilisiert sich auf einem Plateau und liegt bei 46 mM inkubierten Aortenringen mit $8,53 \pm 2,94$ mN auf einem höheren Niveau, als unter 5,75 mM Glukose mit $4,41 \pm 3,13$ mN. Diese Unterschiede sind sowohl bei der Maximalkontraktion als auch bei der Plateaubildung statistisch signifikant. Nach 6 Stunden Inkubation sind die Unterschiede in der Maximalkontraktion und in der Plateaubildung statistisch nicht signifikant. Die Kontraktionen liegen bei $6,87 \pm 2,94$ mN bei 5,75 mM Glukose (n=13) und $6,08 \pm 2,55$ mN bei 46 mM Glukose (n=14).

Abbildung 24

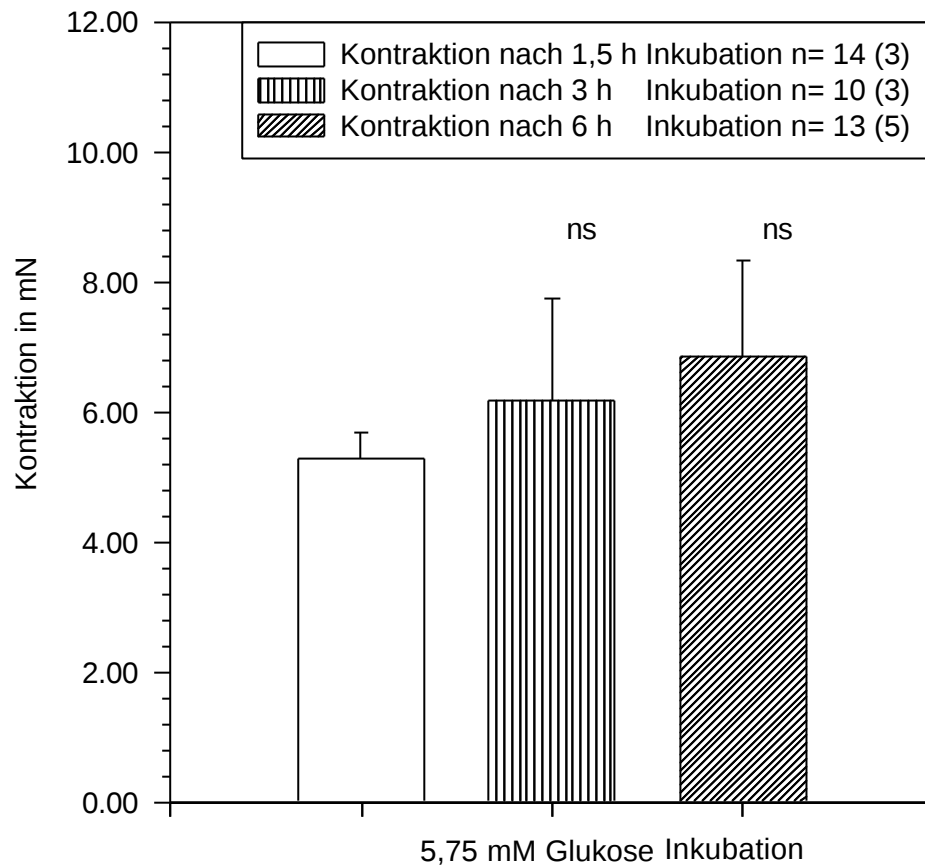


Abbildung 24 zeigt die Veränderung der Kontraktion von Aortenringen der Ratte auf Phenylephrin. Die Aortenringe sind in 5,75 mM Glukose inkubiert. Eine Veränderung der Kontraktion mit verlängerter Inkubationszeit zeigt sich nicht. ($ns = p > 0,05$)

Abbildung 25

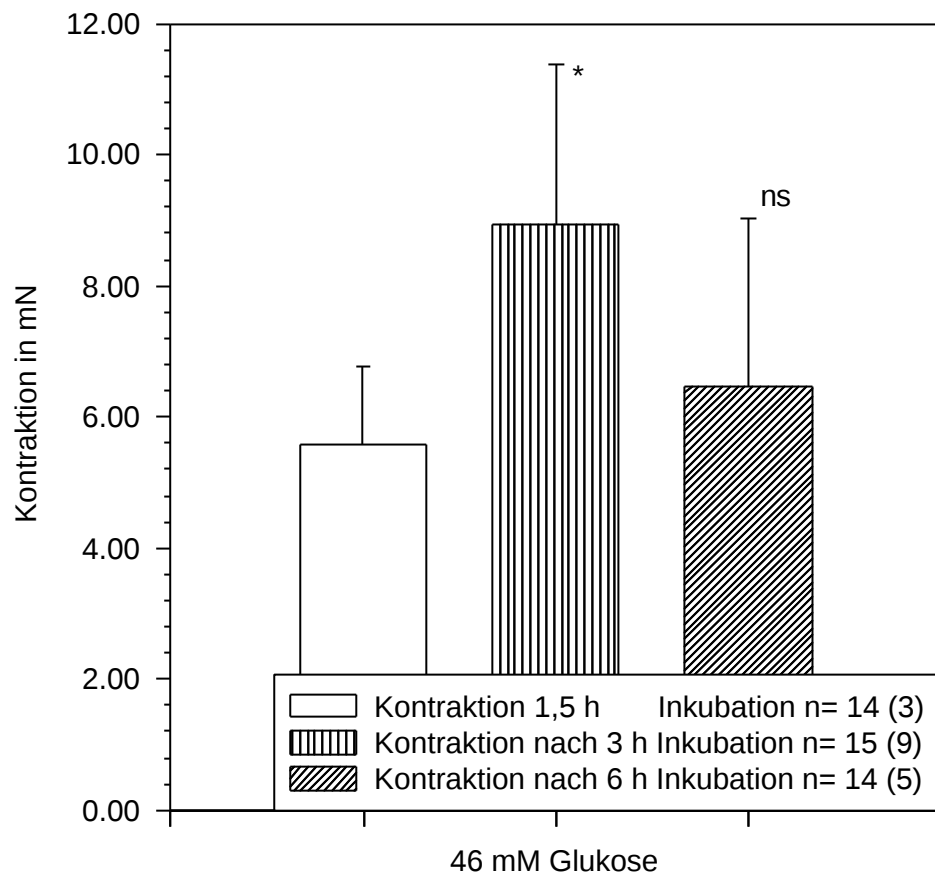


Abbildung 25

Veränderung der Kontraktion von Aortenringen des Ratte unter 46 mM Glukose im Verlauf der Zeit. Nach 3 Stunden Inkubation in 46 mM Glukose kontrahieren die Aortenringe signifikant stärker im Vergleich zur 1,5 Stunden Kontrolle. Nach 6 Stunden Inkubation fällt die Kontraktion signifikant gegenüber den 3 Stunden inkubierten Ringen wieder ab ($p < 0,05$).*

3.4.1 Einfluss von Inkubationszeit auf die Relaxation durch Acetylcholin

Unter 5,75 mM Glukose führt die Gabe von Acetylcholin zu einer maximalen Relaxation von $99 \% \pm 11 \%$ bei 90 Minuten Inkubation ($n=14$), bei 3 Stunden Inkubation zu einer maximalen Relaxation von $93 \% \pm 10 \%$ ($n=10$), und bei 6 Stunden Inkubation ist die maximale Relaxation auf $32 \% \pm 9 \%$ ($n=14$) eingeschränkt. Das Integral der Relaxationskurve nach 1,5 Stunden Inkubation beträgt $346,76 \pm 38,3$ ($n=14$), nach 3 Stunden Inkubation $365,70 \pm 60,16$ ($n=10$) und nach 6 Stunden $129,01 \pm 38,97$ ($n=14$). Das Integral der Relaxationskurve nach 6 Stunden Inkubation ist statistisch signifikant gegenüber der Relaxationskurve nach 1,5 Stunden und 3 Stunden Inkubation eingeschränkt. Die Relaxationskurven nach 3 Stunden und 1,5 Stunden Inkubation unterscheiden sich nicht. Unter 46 mM Glukose und nach 1,5 Stunden Inkubation führt die Gabe von Acetylcholin zu einer maximalen Relaxation von $102 \% \pm 7 \%$ ($n=14$), nach 3 Stunden Inkubation ist die Relaxation auf $69 \% \pm 8 \%$ ($n=40$) eingeschränkt, nach 6 Stunden Inkubation ist die maximale Relaxation auf $39 \% \pm 14 \%$ ($n=14$) eingeschränkt. Das Integral der Relaxationskurve nach 1,5 Stunden Inkubation beträgt $326,66 \pm 37,39$ ($n=14$), nach 3 Stunden Inkubation $276,21 \pm 26,71$ ($n=10$), und nach 6 Stunden $133,58 \pm 55,38$ ($n=14$). Das Integral der Relaxationskurve nach 6 Stunden Inkubation ist statistisch signifikant gegenüber den Kurven nach 1,5 Stunden und 3 Stunden Inkubationszeit. Die Relaxationskurve nach 3 Stunden Inkubation ist im Vergleich zur Kurve nach 1,5 Stunden Inkubation signifikant vermindert.

Abbildung 26

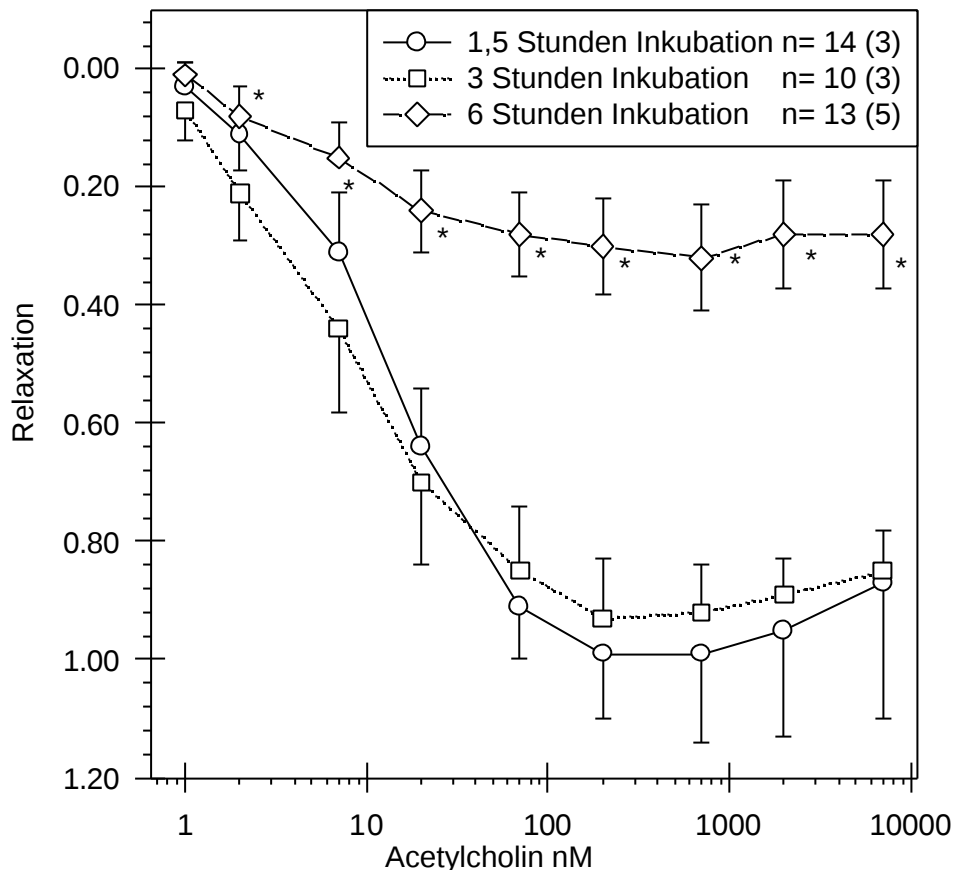


Abbildung 26 zeigt die Relaxation von Aortenringen der Ratte durch Gabe von Acetylcholin. Die Abbildung zeigt den Einfluss der Inkubationszeit auf die Relaxation. Die Relaxation der Aortenringe ist nach 6 Stunden stark eingeschränkt.

Abbildung 27

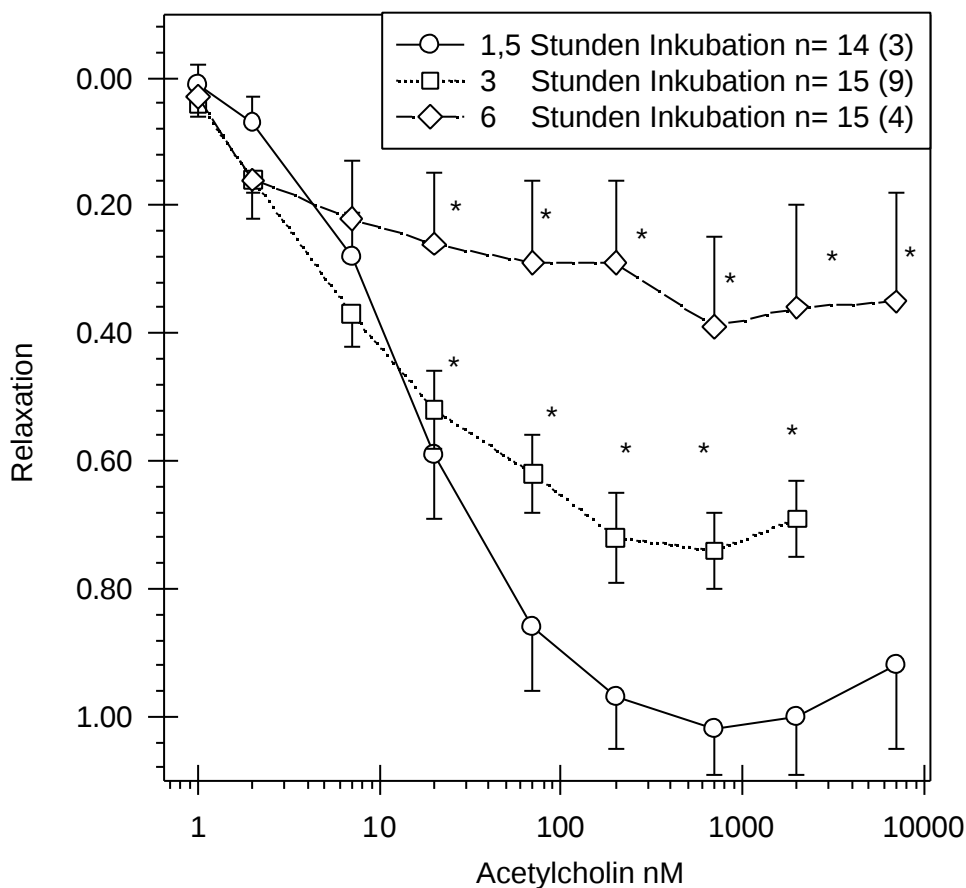


Abbildung 27 zeigt die Relaxation von Aortenringen der Ratte durch Acetylcholin. Unter 46 mM Glukose sind Aortenringe der Ratte sowohl nach 6 Stunden Inkubation als auch nach 3 Stunden verglichen mit der 1,5 Stunden Kontrolle in ihrer Fähigkeit zu relaxieren signifikant vermindert.

3.4.2 Einfluss von Glukose auf die Relaxation durch Acetylcholin

Einfluss von 1,5 Stunden Inkubation auf die Relaxation durch Acetylcholin

Nach 1,5 Stunden Inkubation ist die acetylcholinabhängige Relaxation in den zwei verschiedenen Glukosekonzentrationen nicht voneinander zu unterscheiden. Das Integral der Relaxationskurven beträgt $345,76 \pm 38,30$ ($n=14$) unter 5,75 mM Glukose gegenüber $326,66 \pm 37,39$ ($n=14$) unter 46 mM Glukose. Betrachtet man die einzelnen Relaxationen nach einer jeweiligen Gabe von Acetylcholin, so ist hier bei einer Gabe von $2 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin eine 99 % Relaxation zu sehen. Unter 46 mM Glukose ist hier eine Relaxation von 97 % zu sehen. Die maximale Relaxation beträgt unter 5,75 mM Glukose 99 % und 102 % unter 46 mM Glukose bei einer Gabe von $7 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin. Der Vergleich der einzelnen Gaben ergibt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Inkubation in 5,75 mM und 46 mM Glukose.

Einfluss von 3 Stunden Inkubation auf die Relaxation

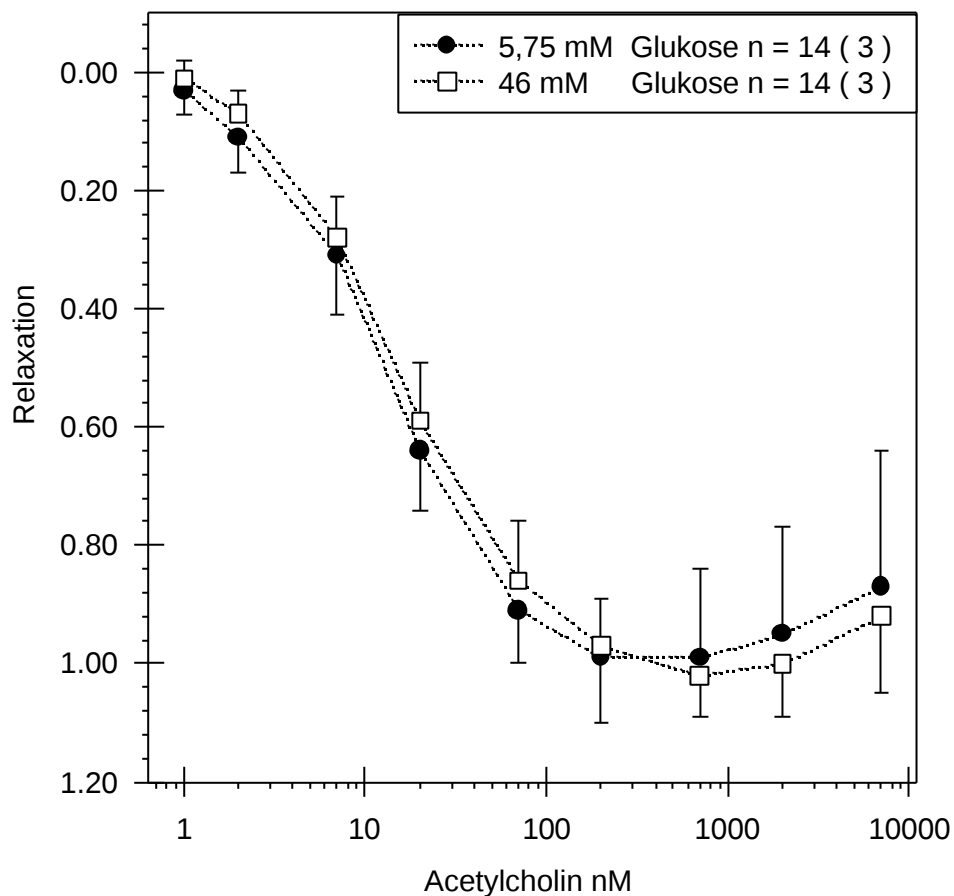
Nach 3 Stunden Inkubation beträgt das Integral der 5,75 mM Glukosekurve $365,70 \pm 60,16$ ($n=10$) und das der 46 mM Glukosekurve $278,21 \pm 26,71$ ($n=40$). Das Integral der 46 mM Glukosekurve ist statistisch signifikant vermindert. In Abbildung 31 ist dieser Zusammenhang dargestellt. Betrachtet man die einzelnen Relaxationen nach einer jeweiligen Gabe von Acetylcholin, so ist bei einer Gabe von $2 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin eine 93 %ige Relaxation zu sehen. Unter 46 mM Glukose zeigt sich eine Relaxation von 72 %. Die maximale Relaxation beträgt unter 5,75 mM Glukose 93% gegenüber 74 % unter 46 mM Glukose bei $2 \cdot 10^{-7}$ M und $7 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin. Der Vergleich einzelner Gaben ergibt statistisch signifikante Einschränkungen in der Relaxation unter 46 mM Glukose in allen Acetylcholin Konzentrationen bis auf die 10^{-9} M Acetylcholingabe.

Einfluss von 6 Stunden Inkubation auf die Relaxation

Nach 6 Stunden Inkubation ist die Relaxation stark eingeschränkt.

Das Integral der 5,75 mM Glukosekurve beträgt $129,01 \pm 38,97$ (n=13) gegenüber $133,58 \pm 55,38$ der 46 mM Glukosekurve(n=14). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Die Relaxation bei einer Gabe von $2 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin beträgt $32\% \pm 9\%$ unter 5,75 mM Glukose und $39\% \pm 14\%$ unter 46 mM Glukose, dies entspricht auch der maximalen Relaxation. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 29 veranschaulicht.

Abbildung 28



Die **Abbildung 28** zeigt den Relaxationsverlauf von Aortenringen der SHSP-Ratte nach Gabe von Acetylcholin. Die Abbildung zeigt, dass eine Inkubationszeit von 1,5 Stunden ohne Einfluss auf die Relaxation bleibt.

Abbildung 29

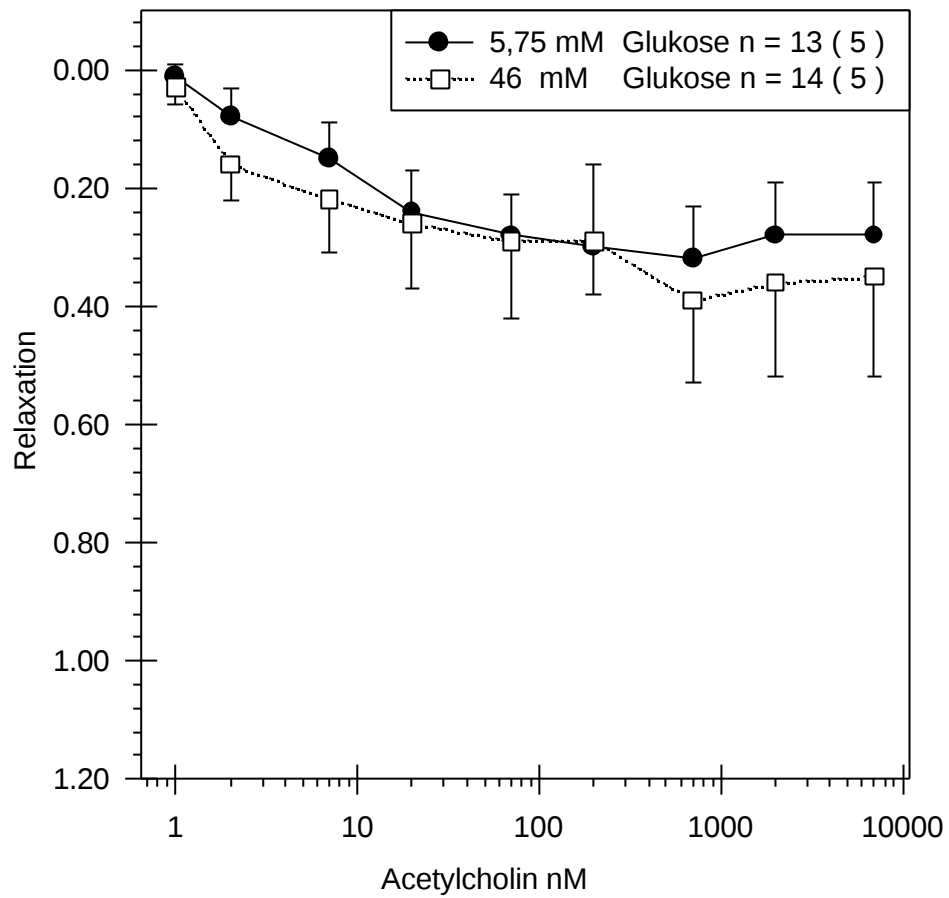
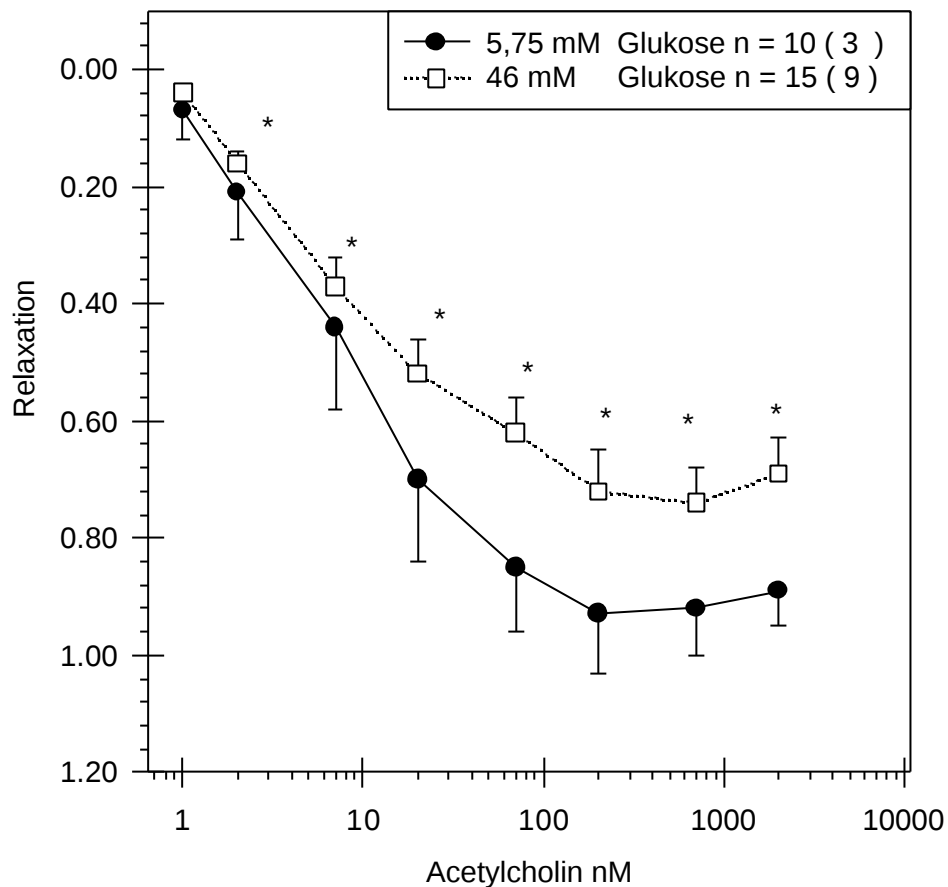


Abbildung 29 zeigt den Relaxationsverlauf von Aortenringen der Ratte nach Gabe von Acetylcholin. Nach 6 Stunden hat die ist die Relaxation von Aortenringen der Ratte deutlich eingeschränkt.

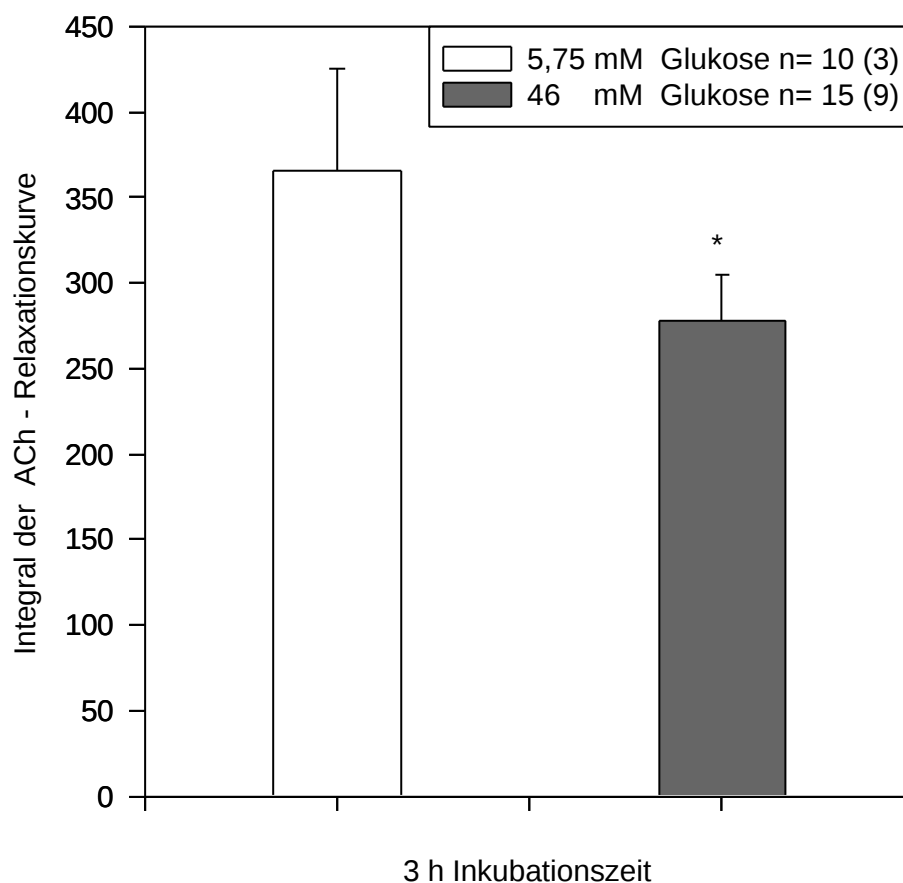
Abbildung 30



Abbildungen 30 und 31

zeigen den Relaxationsverlauf (30) und das Integral (31) der Relaxationskurven von Aortenringen der Ratte nach Gabe von Acetylcholin. Nach 3

Abbildung 31



Stunden Inkubationszeit ist die Relaxation statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle vermindert. (* entspricht $p < 0,05$)

3.4.3 Einfluss von Imidazolinen auf Relaxation und Kontraktion

Eigenwirkung von Moxonidin auf den isolierten Aortenring

Es wurde die Eigenwirkung von 10^{-7} M Moxonidin (n=13) am Aortenring der SHSP-Ratte untersucht, indem die Substanz 10 Minuten auf das Gefäß einwirkte. In dieser Konzentration zeigte Moxonidin keine Wirkung auf das Gefäß. Der Gefäßtonus sinkt um $2 \% \pm 4 \%$ (n=13).

Eigenwirkung von Clonidin auf den isolierten Aortenring

Es wurde die Eigenwirkung von 10^{-8} M Clonidin (n=14) am Aortenring der SHSP-Ratte untersucht, indem die Substanz 10 Minuten auf das Gefäß einwirkte. In dieser Konzentration hat Clonidin keine Wirkung auf das Gefäß. Der Gefäßtonus sinkt um $5 \% \pm 4 \%$ (n=15). Ein Unterschied zwischen 10^{-7} M Moxonidin und 10^{-8} M Clonidin in der Eigenwirkung lässt sich statistisch nicht feststellen.

3.4.4 Einfluss von Imidazolinen auf die Relaxation durch Acetylcholin

3.4.4.1 Einfluss von Moxonidin auf die Relaxation

10^{-7} M Moxonidin führt zu einer maximalen Relaxation durch Acetylcholin von $78 \% \pm 7 \%$ (n=13), die Glukosekontrolle zu einer maximalen Relaxation von $69 \% \pm 8 \%$ (n=40). Die Relaxation durch Moxonidin ist im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle nicht zu unterscheiden.

Das Integral der Moxonidin-Relaxationskurve liegt mit $286,94 \pm 30,58$ (n=13) über dem Integral der 46 mM Glukosekontrolle mit $278,21 \pm 26,71$, jedoch unter der 5,75 mM Glukosekontrollkurve mit $365,70 \pm 60,16$ (n=10). Statistisch unterscheidet sich das Integral der Moxonidinrelaxationskurve nicht von der 46 mM Kontrolle, jedoch ist die Relaxation statistisch signifikant gegenüber der 5,75 mM Kontrolle vermindert. 10^{-7} M Moxonidin ist nicht in der Lage, die durch die Glukose und Inkubationszeit bedingten Einschränkungen der Relaxation aufzuheben.

Abbildung 32

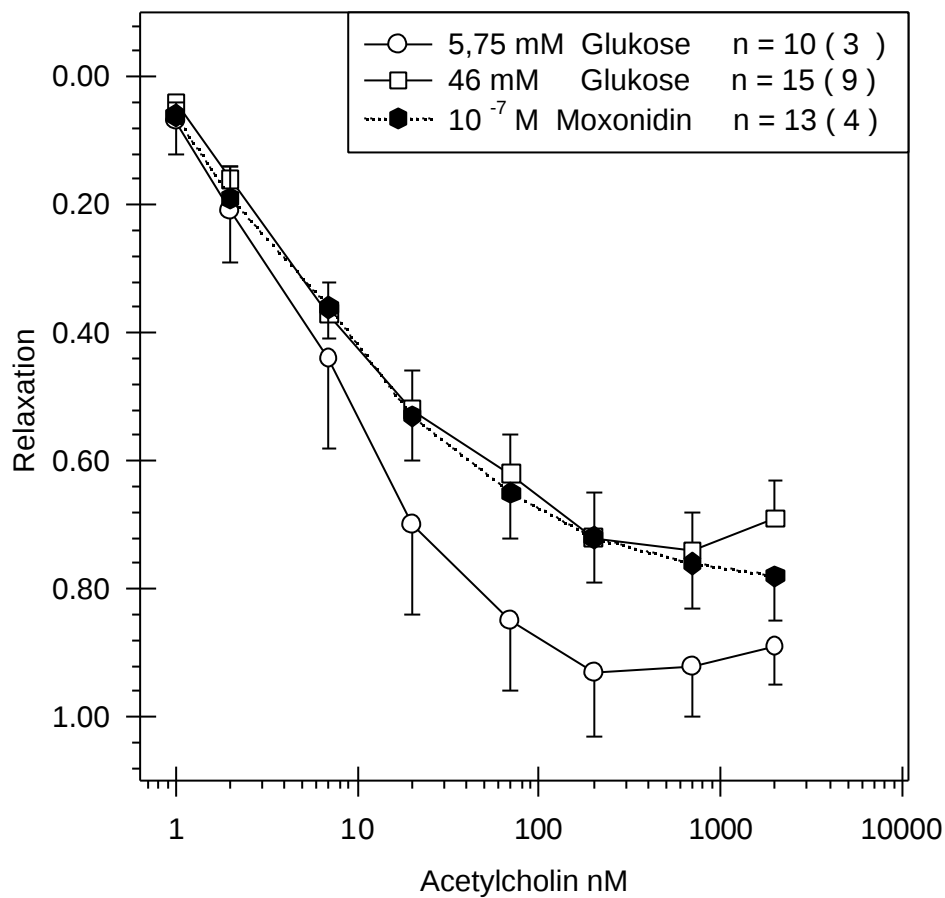


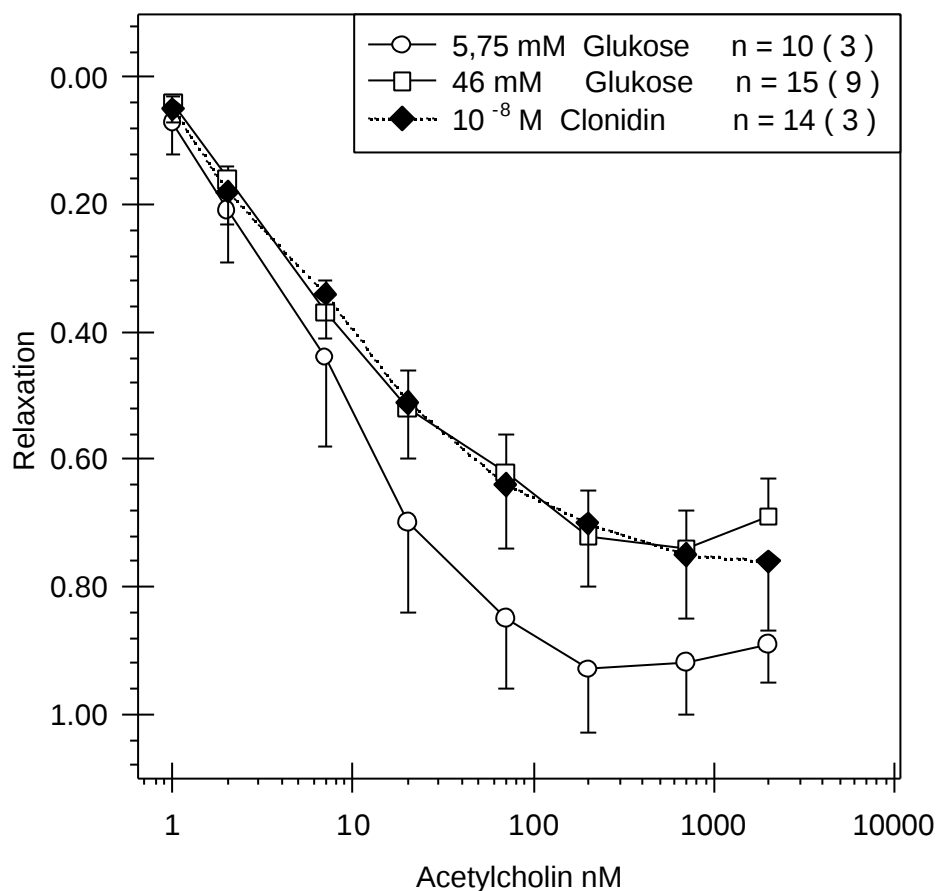
Abbildung 32

zeigt den Relaxationsverlauf von Aortenringen der Ratte durch Gabe von Acetylcholin nach Inkubation mit 10^{-7} M Moxonidin unter 46 mM Glukose.

3.4.4.2 Einfluss von Clonidin auf die Relaxation

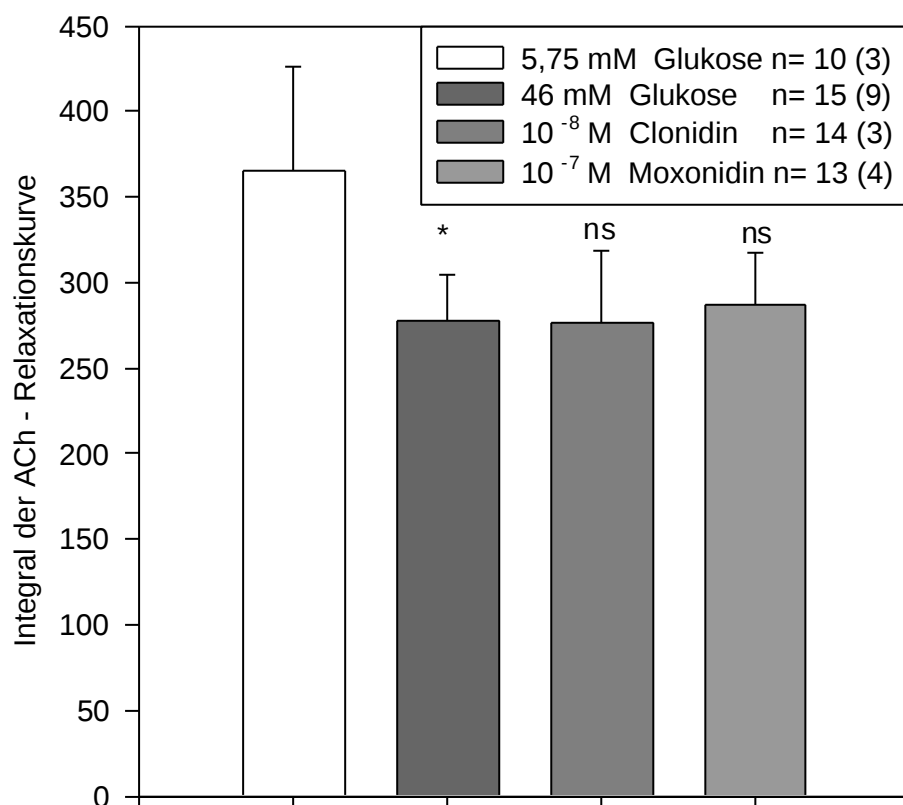
10^{-8} M Clonidin führt zu einer maximalen Relaxation durch Acetylcholin von $76 \% \pm 7 \%$ ($n=14$), die entsprechende Glukosekontrolle zu einer Relaxation von $69 \% \pm 8 \%$ ($n=40$). Die Gabe von 10^{-8} M Clonidin beeinflusst den Relaxationsverlauf gegenüber einer Glukosekontrolle nicht. Das Integral der relativen Relaxation unterscheidet sich mit $277,08 \pm 41,96$ ($n=14$) statistisch nicht von der 46 mM Kontrolle mit $278,21 \pm 26,71$, jedoch ist das Integral der Clonidinrelaxationskurve im Vergleich zur 5,75 mM Kontrolle statistisch signifikant vermindert. 10^{-8} M Clonidin ist nicht in der Lage, die durch die Glukose und inkubationszeitbedingten Einschränkungen der Relaxation aufzuheben.

Abbildung 33



Die **Abbildung 33** zeigt den Relaxationsverlauf von Aortenringen der SHSP-Ratte durch Gabe von Acetylcholin nach Inkubation mit 10⁻⁸ M Clonidin in 46 mM Glukose. 10⁻⁸ M Clonidin zeigt keine Auswirkung auf den Relaxationsverlauf.

Abbildung 34



In **Abbildung 34** sind die Integrale der mit Moxonidin und Clonidin inkubierten Relaxationskurven von Acetylcholin dargestellt. Weder Moxonidin noch Clonidin zeigen einen Einfluss auf die Relaxation von Aortenringen der Ratte unter Glukosebelastung.

3.4.5 Einfluss des PKC-Hemmers LY333531 auf die Relaxation durch Acetylcholin

Eigenwirkung auf das Gefäß

Die Gabe von 10^{-7} M LY333531 führt innerhalb von 10 Minuten Einwirkzeit zu einer Tonusminderung von $19 \% \pm 6 \%$ (n=17).

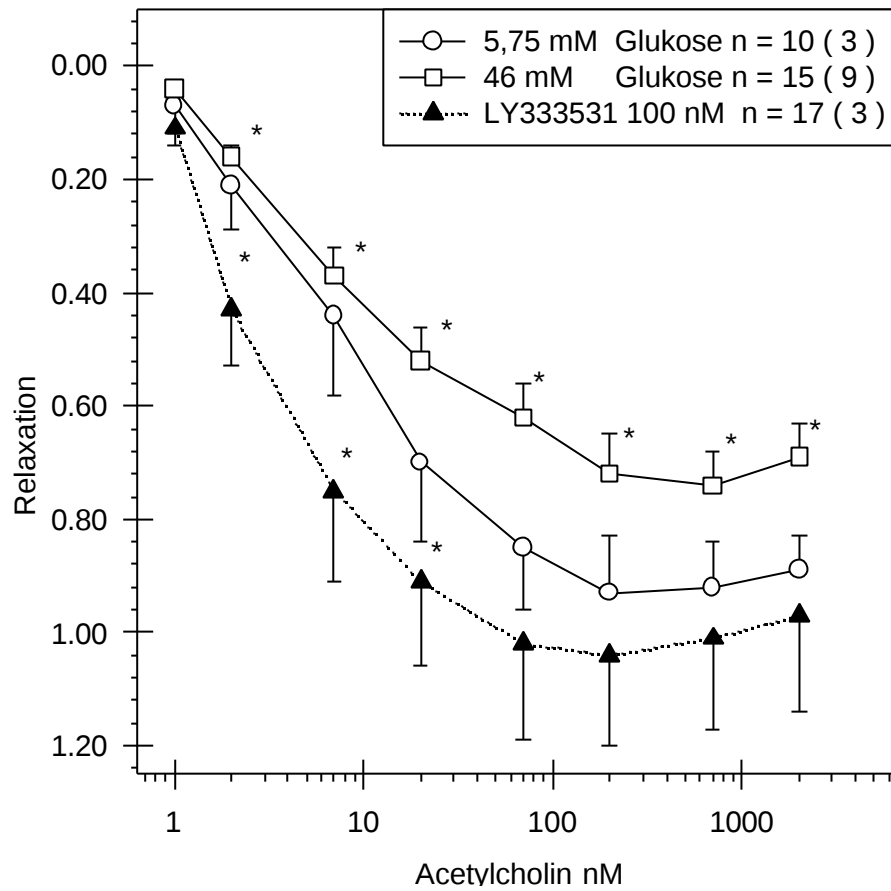
Einfluss von LY333531 auf die Relaxation durch Acetylcholin

10^{-7} M LY333531 führen nach der Gabe von Acetylcholin zu einer starken Relaxation. Sie beträgt im Maximum 104 % ($2 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin), also einer vollständigen Relaxation der durch 10^{-7} M Phenylephrin kontrahierten Gefäße. So führen $2 \cdot 10^{-9}$ M Acetylcholin in der 5,75 mM Glukosekontrolle zu einer Relaxation von $21 \% \pm 8 \%$ (n=17) und nach Gabe von 10^{-7} M LY333531 zu einer Relaxation in Höhe von $43 \% \pm 10 \%$ (n=17).

Das Integral der relativen Relaxation beträgt $576,25 \pm 93,49$ (n=17) und ist im Vergleich zur 46 mM Glukosekontrolle mit $278,71 \pm 26,71$ (n=40) statistisch signifikant größer.

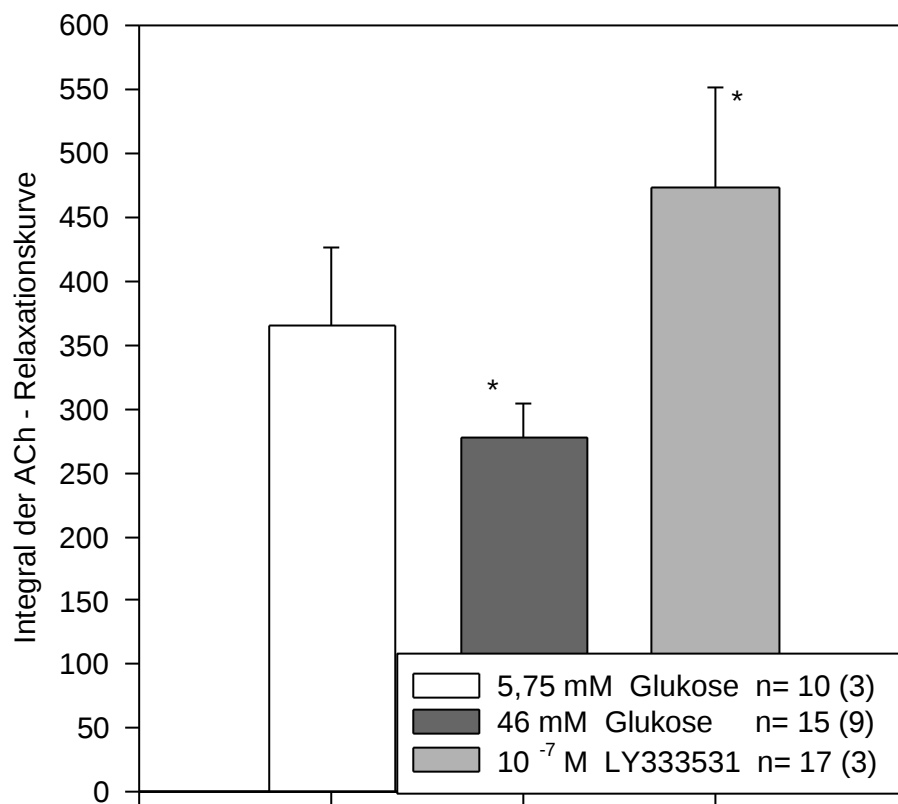
Die Relaxation ist so gross, dass das Integral im Vergleich zur 5,75 mM Glukosekontrolle mit $365,70 \pm 60,16$ (n=10) ebenfalls statistisch signifikant größer ausfällt, die Relaxation also gegenüber der normoglykämischen Glukosekontrolle verstärkt ist.

Abbildung 35



Die Abbildung 35 zeigt den Relaxationsverlauf von Aortenringen der SHSP-Ratte durch Gabe von Acetylcholin nach Inkubation mit 10^{-7} M LY333531, einem PKC Hemmer, unter 46 mM Glukose. 10^{-7} M LY333531 zeigen eine statistisch signifikante Verbesserung der Relaxation. Die Gabe von 100 nM LY333531 ist in der Lage die Einschränkung der Relaxation durch Glukose wieder aufzuheben. (* entspricht $p < 0,05$)

Abbildung 36



In **Abbildung 36** sind die Integrale der Relaxationskurven unter 46 mM Glukosebelastung nach Gabe des PKC Hemmers LY333531 dargestellt. Das Integral der mit dem PKC-Hemmer LY333531-inkubierten Relaxationskurve ist statistisch signifikant größer als die der 5,75 mM und 46 mM Glukosekontrolle. (* entspricht $p < 0,05$)

4 Diskussion

4.1 Kontraktion und Relaxation

Der Tonus eines Gefäßes wird bestimmt von dem Zusammenspiel von Kontraktions- und Relaxationsvorgängen.

Eine Veränderung dieses Zusammenspiels kann Ursache für viele pathologische Gefäßveränderungen sein. Bei der Hypertonie finden sich beispielsweise Gefäßveränderungen unter anderem aufgrund verstärkter Kontraktionsvorgänge. Diese Vorgänge werden durch Verringerung verschiedener relaxierender Faktoren (EDRF [endothelium derived relaxing factors]) und Steigerung kontrahierender Faktoren (EDCF [endothelium derived contracting factors]) hervorgerufen. Das Endothel übernimmt die bedeutendste Funktion bei der Produktion dieser Faktoren. Von den, vom Endothel gebildeten, Relaxationsfaktoren (EDRF)^[32] ist der Wichtigste als Stickstoffoxid NO^[85] identifiziert worden, beziehungsweise als Derivate, welche von der Aminosäure L-Arginin abstammen.^[84] Als weitere relaxierende Faktoren werden unter anderem Prostacyclin, Bradykinin und ein Hyperpolarisationsfaktor diskutiert.^[90] Ebenso werden kontrahierende Substanzen im Endothel produziert. Hier werden Faktoren wie Endothelin, Superoxid-Anion, Thromboxan,^[90] Prostaglandine^[48,105] und lokal produziertes Angiotensin 2 genannt sowie ein weiterer Faktor, welcher aber nur unzureichend charakterisiert ist.^[90]

Nicht nur diese Tonusveränderungen sind ursächlich für viele Erkrankungen, es werden weitere Effekte dieser Substanzen diskutiert, die für die arteriosklerotischen Veränderungen eine wichtige pathogenetische Rolle spielen sollen. Neben der direkten Gefäßwirkung sollen diese endothelial produzierten Substanzen noch eine Wirkung auf die Plättchen-Adhäsion und -Aggregation, sowie eine Wirkung auf die Zellproliferation haben.^[90]

Stickstoffmonoxid (NO) soll in der Pathogenese von Gefäßveränderungen, wie die der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielen.^[90]

Bei der Entwicklung der Atherosklerose findet man Veränderungen von ecNOS und der nNOS, die verantwortlich für die Bildung von NO sind.^[114]

Weiterhin soll ein Superoxid-Anion verstärkt gebildet werden, welches das effektiv vorhandene NO vermindert, indem NO inaktiviert wird und damit lokal kontrahierend wirkt.^[112] Wir nehmen an, dass das in der Konzentration verminderte NO ursächlich für Gefäßveränderungen über eine direkte primäre und sofortige Gefäßwirkung und über sekundäre Wirkungen wie zum Beispiel über Plättchenadhäsion und Zellproliferation ist.^[90]

Die Gabe von Phenylephrin führt an isolierten Aortenringen des weissen Neuseeländischen Kaninchens zu einer phasischen Kontraktion. Diese wird über α_1 -Rezeptoren vermittelt. Welche Subklasse der α_1 -Rezeptoren an der Kontraktion der Aortenringen des Kaninchens beteiligt ist, ist nicht eindeutig geklärt. Es wird ein Mechanismus über α_{1b} -Subklassen vermutet, bzw. eine Kombination aus verschiedenen Subrezeptoren ($\alpha_{1a} + \alpha_{1b}$).

Weiterhin kommt es gleichzeitig mit der Kontraktion über α_1 -Rezeptoren zu einer Gegenregulation durch das Endothel. Dies zeigt sich nach Gabe von L-NNA (N^G -Nitro-L-Arginin) oder nach Entfernung des Endothels. In beiden Fällen fällt die Kontraktion wesentlich stärker aus.^[67]

Es wurde festgestellt, dass Phenylephrin an isolierten Aortenringen des Schweines nicht nur das IP_3 -Second-Messenger System beeinflusst sondern auch den Spiegel von cGMP steigern kann.^[87] Dies hätte ebenfalls eine Wirkung auf die Aktivität der NOS. Die Bedeutung ist jedoch gering da Phenylephrin an Aortenringen des Kaninchens und der Ratte zusammenfassend zu einer lang anhaltenden und starken Kontraktion führt. Der α_1 -Rezeptor aktiviert seinerseits ein G-Protein der G_q -Familie; dieses stimuliert die phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C (PI-PL C); als Second Messenger entstehen Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin; IP_3 setzt aus dem endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} frei; Diacylglycerin aktiviert die Proteinkinase C, die spezifische Zielproteine phosphoryliert.^[31]

Die Wirkung der Kontraktion wird zu einem großen Anteil über die Mobilisierung von Ca_i^{2+} (intracellulär) zu einem kleineren Teil (maximal 30 %) über eine Aktivierung der PKC vermittelt.^[50] Die primäre Kontraktion ist nur wenig abhängig von extrazellulärem $\text{Ca}_{\text{ex}}^{2+}$. In einem Ca^{2+} -freien Medium ist die Kontraktion um etwa 20 % eingeschränkt, so dass angenommen wird, dass der Grossteil der Kalziummobilisation aus dem endoplasmatischen Retikulum erfolgt.^[50] Die gleichzeitige Gabe von H7, einem PKC-Hemmer, kann die Kontraktionshöhe nicht signifikant ändern, jedoch wird die anhaltende Kontraktion in Ca^{2+} -freiem Medium abgeschwächt.^[50] Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Konzentrationen können die Kraft der Kontraktion beeinflussen,^[9,30] da letztendlich zum Auslösen der Kontraktion eine Modulation des Ca^{2+} -Spiegels notwendig ist.

Während der Dauer der Inkubation kam es in unseren Versuchen zu einer langsamen Minderung der Kontraktion im zeitlichen Verlauf. So nimmt die Kraft der mit Phenylephrin kontrahierten Ringe 3 Stunden nach der Kontraktion um 15 % (n=6) ab. Bei der Relaxation der Aortenringe durch Acetylcholin bleibt dieser Effekt unberücksichtigt, da ein Unterschied in der Kontraktion und Relaxation bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen ausgearbeitet werden soll und diese unspezifische Abnahme der Kontraktion in beiden Versuchssarmen auftritt. Die so vorkontrahierten Ringe, werden nun mit Acetylcholin in steigender Konzentration versetzt. In Blutgefäßen erfolgt als Endprodukt die Freisetzung von NO über verschiedene muskarinerge Rezeptoren. In der Aorta des weissen Neuseeländischen Kaninchens werden diese überwiegend über M_3 -muskarinerge Rezeptoren vermittelt.^[8,42]

An isolierten Aortenringen der spontan hypertensiven Ratte, welche zu Schlaganfällen neigt (SHSP), führt die Gabe von 100 nM Phenylephrin zu einer Kontraktion. Diese wird ebenfalls über α_1 -Rezeptoren ausgelöst. Welche Subklasse der α_1 -Rezeptoren an der Kontraktion an der SHSP-Ratte ist, ist nicht eindeutig beschrieben.

Es wird vermutet, dass es sich bei den α_1 -Rezeptoren in der Aorta der Ratte um bekannte α_{1B} ^[106] oder um α_{1B} und α_{1A} ^[108] oder um von α_{1B} und α_{1A} verschiedene (α_{1L} , α_{1N})^[75] Rezeptoren handelt.

Ein wesentlicher Unterschied des Relaxationsmodelles isolierter Aortenringe der SHSP-Ratte ist, dass bei diesen Tieren das System der Proteinkinase C im Sinne einer Steigerung verstärkt auf Reize reagiert. Ein Vergleich der SHSP-Ratte mit einer vergleichbaren Rasse, den Wistar-Kyoto-Ratten zeigt, dass bei SHSP- Ratten zwar keine signifikante Proteinkinase C-Aktivierung erfolgt, aber die Aortenringe wesentlich sensibler auf Kontraktionsreize durch PDBu (Phorboldibutyrate), einem Proteinkinase C-Aktivator, reagieren.^[5]

Proteinkinase C-Aktivatoren, wie Phorboläster, sind nämlich in der Lage, bei SHSP-Ratten Kontraktionen auszulösen.^[36] Diese Veränderungen sind abhängig von der Ausprägung eines Bluthochdruckes. So verändert das Alter der Tiere sowohl Kontraktions- als auch Relaxationsverhalten dieser Aortenringe,^[56,116] da der arterielle Hypertonus erst bei adulten SHSP-Ratten ausgebildet wird. Die glukoseabhängige Relaxationsminderung zeigt geschlechtsabhängige Unterschiede.^[49] Dies kann daran liegen, dass im Vergleich zu weiblichen Ratten bei männlichen Ratten ein höherer arterieller Bluthochdruck ausprägt ist.

Durch die Gabe von Acetylcholin werden verschiedene Subklassen von muskarinergen Rezeptoren angesprochen^[4] ; im wesentlichen werden aber M₃ und M₂ muskarinerge Acetylcholinrezeptoren bei der Relaxation isolierter Aortenringe der Ratte diskutiert. Der Diabetes mellitus mit seinen metabolischen Entgleisungen, insbesondere Hyperglykämien und Lipidstoffwechselstörungen, ist Risikofaktor erster Ordnung für die Arteriosklerose. Insbesondere die Hyperglykämie und der arterielle Hypertonus sind an der Entwicklung von Mikro- und Makroangiopathien von besonderer Bedeutung.^[1,18,109] Weiterhin wird angenommen, dass Insulinresistenz und hohe Insulinkonzentrationen dabei eine wichtige Rolle spielen.^[22,24,93]

Die Diabetes Control and Complication Trial Studie und die United Kingdom Prospective Diabetes Study^[1,109] haben gezeigt, dass eine gute Einstellung des Diabetes mellitus, also das Vermeidung von Hyperglykämien, das Erscheinen von Mikroangiopathien und Neuropathien verhindern und kardiovaskuläre Schäden vermindern kann.^[107]

Eine große Anzahl von Studien haben eine mögliche Rolle der Hyperglykämie und deren Mechanismen bei der Induktion von Gefäßveränderungen beschrieben.^[15,19,39,51,57,88,103,105,115]

Es wird vermutet das Stickstoffmonoxid NO in der Pathogenese von Gefäßveränderungen, wie beispielsweise bei der Atherosklerose, eine wichtige Rolle spielt.^[90] NO zeigt nicht nur eine relaxierende Wirkung auf das Gefäß sondern kann auch die Plättchen-Adhäsion, -Aggregation und Zellproliferation beeinflussen.^[90] Bei der Atherosklerose findet man Veränderungen von ecNOS und der nNOS.^[114] Im Rahmen der Atherosklerose sollen ecNOS-Protein und ecNOS- mRNA vermindert sein.^[15,114]

Die Aussagen über die Aktivität differieren aber in verschiedenen Modellen und Spezies.^[86] So gibt es unterschiedliche Aussagen bezüglich der ecNOS-Aktivität und der NOS- Gesamtaktivität. Es häufen sich aber Annahmen, dass bei der Atherosklerose Verminderungen des ecNOS-Proteins und der ecNOS-mRNA auftreten.^[15,114]

Weiterhin gibt es Überlegungen, dass zwar die ecNOS-Aktivität erniedrigt aber iNOS-Aktivität erhöht ist.^[114] Es kann allerdings mit einer Abnahme der ecNOS- mRNA noch nicht zwingend eine Abnahme der lokalen NO-Konzentrationen gefolgert werden.

Durch die Inkubation in 46 mM Glukose werden die DAG-Spiegel erhöht, die nachfolgend die Proteinkinase C aktivieren. Eine Steigerung der Aktivität der Proteinkinase C kann durch die Regulation der NOS eine verminderte Relaxation bewirken. Neben dieser Wirkung, werden weitere pathophysiologische Mechanismen, die für die diabetische hyperglykämische Gefäßschädigung verantwortlich sein sollen, genannt.

Chronische Hyperglykämie ist eine Ursache von verstärkter vaskulären Rigidität aufgrund von strukturellen Umbauvorgängen.

In hohen Konzentrationen scheint Glukose sogar einen direkten toxischen Effekt auf humane Endothelzellen zu haben.^[65]

Glukose kann so zu veringertem endothelabhängiger Relaxation, vermehrter Kontraktion, Entwicklung von Hyperplasie bei glatten Gefäßmuskelzellen und dem vaskulären Umbau (Remodeling) führen.

Es wurde gezeigt, dass hohe Glukosespiegel in humanen glatten Gefäßmuskelzellen Fibronectin und Kollagen 4 eine Überexpression induzieren können.^[97]

Weiterhin werden direkte Glykosylierungen und Ablagerung höhergradiger Glykolysierungsprodukte in die Gefäßwand als Ursache für Gefäßveränderungen angeführt.

Isolierte Organpräparationen

Der Versuchsaufbau isolierter Aortenringe ist ein in-vitro Relaxationsmodell, in welchem eine Gefäßtonussteuerung nur lokalen Auswirkungen ausgesetzt ist. Darunter fallen Abgabe von relaxierenden und kontrahierenden Substanzen aus dem Endothel und den Wirkmechanismen zwischen Endothel und Gefäßmuskulatur. Eine Tonusbeeinflussung über höhergesteuerte Regulationsmechanismen ist schon aufgrund des Modellaufbaus ausgeschlossen. Deshalb lassen sich mit diesem Modell Aussagen zum Gefäßtonus treffen, welche möglicherweise wegen einer zentralen Gegenregulation nicht darstellbar wären. In dieser Tatsache liegen aber auch die Beschränkungen dieses Modells. Es lassen sich globale Aussagen über den gesamten Organismus nur beschränkt machen. Eine Interpolation dieser Ergebnisse auf die Spezies Mensch auf Grund möglicher Speziesunterschiede in der Rezeptorverteilung von Muskarinrezeptoren, Imidazolinrezeptoren und α -Rezeptoren ist gegebenenfalls eingeschränkt. Auf der anderen Seite, untersucht dieses Modell nicht niedriger gesteuerte Regulationsmechanismen, weshalb die Aussagefähigkeit auf molekularer Ebene und auf der Ebene einzelner Rezeptormechanismen oder Second- und Third-Messenger-Systemen eingeschränkt ist. Es werden allerdings auch die Probleme komplexer Interaktionen in Kontraktions- und Relaxationsprozessen umgangen, die immer noch Gegenstand derzeitiger Forschung sind.

Wir haben an vorkontrahierten Aortenringen Acetylcholin in steigender Konzentration zur Relaxation in das Badgefäß gegeben. In welchem Ausmaß Acetylcholin in einem Badgefäß einem unspezifischen Abbau unterliegt ließ sich in der Literatur nicht klären. Aufgrund der Fragestellung dieser Arbeit, ist die genaue Acetylcholinkonzentration nicht relevant, da diese Veränderungen in sowohl in normoglykämischen als auch unter hyperglykämischen Bedingungen auftreten.

Die wahre Acetylcholinkonzentration bei einer Gabe von $2 \cdot 10^{-7}$ M, liegt zwischen $2 \cdot 10^{-7}$ (Einzelgabe) und $3 \cdot 10^{-7}$ M Acetylcholin (Einzelgabe+Kumulation). In der weiteren Darstellung ist von einem vollständigen unspezifischen Abbau ausgegangen worden.

Die Höhe der Glukosebelastung liegt bei 46 mM Glukose und ist, einmal von exzessiven hyperglykämischen Anfällen abgesehen, nicht physiologisch beziehungsweise wird bei einem Diabetiker unter üblicher Führung selten gefunden.

Die Höhe von 46 mM Glukose ist so hoch gewählt worden, um die Gefäße in diesem Modell zu schädigen. Da die Inkubationszeit für die Aortenringe der limitierende Faktor ist,^[66] ist die Glukosehöhe unphysiologisch hoch gewählt worden.

Weiterhin wurde die Organpräparation ohne eine gerinnungshemmende Substanz wie Heparin durchgeführt worden, da gezeigt wurde, dass Heparin die Aktivität der NOS beeinflussen kann.^[111]

Auf der anderen Seite ist bekannt, dass eine Hypoxie negativ auf die endothelabhängige Relaxation wirken kann.^[119]

Um eine Interaktion des Heparins mit dem Endothel auszuschliessen haben wir unsere Präparationen ohne Heparin durchgeführt.

Wir bestätigen am Modell des weissen Neuseeländischen Kaninchens, dass die endothelabhängige Relaxation mit der Substanz Acetylcholin durch Glukosebelastung eingeschränkt ist. Die Verminderung der endothelabhängigen Relaxation durch Acetylcholin ist übereinstimmend mit den meisten Arbeiten auf diesem Gebiet.^[9,32,103] Es finden sich allerdings auch Arbeiten, die keine Auswirkung der Hyperglykämie auf die Relaxation durch Acetylcholin finden.^[3]

Schon früh wurde erkannt, dass die Gabe von Acetylcholin nicht nur zu einer Relaxation sondern auch zu Kontraktionen nach höheren Acetylcholindosen führte, und dass das Endothel die Schlüsselrolle in diesem Prozess spielt.^[32] Die Hypothesen über die Ursache variierten. Ob also eine vermehrte Ausschüttung vasokonstriktorischer Faktoren an isolierten Aortenringen des Kaninchens eine Rolle spielt oder ob eine verminderte Ausschüttung vasorelaxierend wirkender Substanzen wie zum Beispiel NO eine Rolle spielt, wird derzeitig kontrovers diskutiert.^[9,104,105] An isolierten Aortenringen der SHSP-Ratte wird von den meisten Arbeitsgruppen eine ausgeprägte Kontraktion nach einer Gabe von Acetylcholin nicht gesehen. Wir konnten in Übereinstimmung mit vielen Arbeiten eine Minderung der Relaxation durch Inkubation in 46 mM Glukose zeigen.^[48,56,91,119]

An isolierten Aortenringen des weissen Neuseeländischen Kaninchen führt die Gabe von Phenylephrin nach Inkubation in 46 mM Glukose zu einer unveränderten Kontraktionskraft.

Dieses Ergebnis unterscheidet sich von vielen Arbeiten auf diesem Gebiet. Nach unserer Vorstellung wird der DAG-Pool durch die Inkubation mit Glukose erhöht, was eine PKC-Erhöhung zur Folge hat und eigentlich die Kontraktion verstärken müsste. Es wird eine Erhöhung der Aktivität der ecNOS, trotz einer geminderten Relaxation durch Acetylcholin beschrieben.^[46] Weiterhin gibt es Arbeitsgruppen, die eine NOS-Aktivierung nach Glukosebelastung beschreiben.^[19]

An isolierten Aortenringen der SHSP-Ratte führt die Inkubation in einem hyperglykämischen Medium zu einer Zunahme der Kontraktion nach 3 Stunden, welche signifikant gegenüber der 5,75 mM Glukosekontrolle erhöht ist. Nach 6 Stunden fällt die Kontraktionskraft wieder ab und ist nicht mehr signifikant erhöht.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse muss man an eine Summation kontrahierender und relaxierender Effekten denken, die sich je nach Inkubationslänge unterschiedlich auswirken.

Es gibt Hinweise, dass an bovinen Endothelzellen der Aorta die ecNOS-mRNA-Expression aufgrund von Scherkräften (shear stress) hochgeregelt^[110] wird. In atherosklerotisch veränderten Gefäßen soll zwar die ecNOS herabreguliert, allerdings iNOS und nNOS hochreguliert sein.^[114]

Wir können uns diesen Effekt erklären, in dem zwar die PKC über den DAG-Pool aktiviert ist, jedoch gegenregulatorische Maßnahmen, wie eine konsekutive iNOS oder nNOS-Erhöhung, beziehungsweise ein besseres Ansprechen dieses Enzymes auf die Auslöser, die Ursache der unveränderten Kontraktion isolierter Aortenringe auf die Gabe von Phenylephrin ist.

Weiterhin wird vermutet, dass es durch die Steigerung der iNOS und nNOS vermehrt zur Bildung eines Superoxid-Anions kommen soll, welches kontrahierend wirkt.

Diese Veränderungen treten in Aortenringen von sowohl des weissen Neuseeländischen Kaninchens nach 6 Stunden Inkubation als auch an isolierten Aortenringen der SHSP-Ratte nach 6 Stunden Inkubation verglichen mit entsprechenden 3 Stunden inkubierten Ringen auf. Eine verstärkte Kontraktion nach Inkubation mit Glukose kann über eine Erhöhung der PKC und durch eine Aktivierung von Kontraktionsmechanismen, und weiterhin mit einer verminderten basalen Ausschüttung relaxierender Faktoren erklärt werden. Eine verstärkte Kontraktion wird an Aortenringen des Kaninchens nicht gesehen. Dies beruht wahrscheinlich aufgrund der Tatsache, dass das Proteinkinase C-System an isolierten Aortenringen des Kaninchens im Vergleich zu Aortenringen der SHSP-Ratte nicht wesentlich gesteigert ist. Zusätzlich haben wir eine Abnahme der Kontraktionskraft im Verlauf der Inkubationszeit isolierter Aortenringe der SHSP-Ratte festgestellt, so daß die längere Inkubationszeit von 6 Stunden und die damit verbundene Endothelreizung und konsekutiver iNOS und nNOS Erhöhung, Ursache für die fehlende Steigerung der Kontraktionskraft sein könnte.

Die acetylcholinbedingte Relaxation isolierten Aortenringen der SHSP-Ratte ist nach 1,5 Stunden Inkubation durch die hyperglykämische Umgebung nicht eingeschränkt. Der wahrscheinlichste Grund hierfür ist die geringe Inkubationszeit, welche für eine Veränderung nicht ausreicht.

In der Plateaubildung der Kontraktion ist aber schon eine Wirkung der PKC-Erhöhung zu sehen.

Nach 3 Stunden Inkubation ist das Gefäß in der hyperglykämischen Umgebung statistisch signifikant in der Relaxation durch Acetylcholin gemindert (Vergleiche Abbildung 30 und Abbildung 31).

Nach 6 Stunden Inkubation ist das Gefäß soweit geschädigt, dass die Relaxation gegenüber den anderen Inkubationszeiten deutlich eingeschränkt ist.

Nach 6 Stunden ist nicht nur die Relaxation eingeschränkt sondern auch die Kontraktion der isolierten Aortenringe.

Diese Veränderungen könnten mit einer gesteigerten PKC-Aktivität erklärt werden, der eine durch Scherkräfte verursachte eNOS Verminderung und iNOS und nNOS Erhöhung gegenübersteht. Dies hätte zur Folge, dass einerseits die Relaxation durch das gesteigerte PKC-System eingeschränkt ist und andererseits NO und im Anteil Superoxid-Anion vermehrt gebildet werden, die die Abnahme der Kontraktionserhöhung erklären könnten.

In der Literatur finden sich auch Arbeiten, die keine Veränderungen auf Gefäße gesehen haben. Massa & al. untersuchten die Veränderung der Gefäße durch Inkubation in verschiedenen Medien und sahen nach 6 Stunden noch keine relevanten Veränderungen der Relaxation und Kontraktion, allerdings wurden dort die Gefäße im Ganzen inkubiert und nicht der einzelne vorkontrahierte Ring untersucht.^[66]

4.2 Wirkungsmechanismus von Imidazolinen bei Kontraktions und Relaxationsvorgängen

Substanzen dieser Klasse können über verschiedenen Mechanismen in Kontraktions- und Relaxationsvorgänge an den Gefäßen eingreifen.

Sowohl Moxonidin^[17,25,31,74] als auch Clonidin^[31,92] sind Agonisten an α_2 -adrenergen Rezeptoren. Beide Substanzen sind schwache Agonisten am α_1 -adrenergen Rezeptor.^[25,31] Hiervon abweichend wird von einem dualen Effekt von Clonidin an Adrenozeptoren der Arteria Mesenterica berichtet. Clonidin soll hier einen α_2 -agonistischen und α_1 -antagonistischen Effekt haben.^[101]

Die α_2 -agonistischen Wirkung kann weiter spezifiziert werden in eine prä- und eine postsynaptische α_2 -agonistische Wirkung. Moxonidin ist an beiden Subklassen ein voller Agonist.^[25] Moxonidin hat eine höhere Affinität zu α_{2A} -Rezeptoren im Vergleich zu α_{2B} -Rezeptoren.^[25]

Weiterhin ist sowohl Moxonidin als auch Clonidin ein Agonist an vermuteten Imidazolinrezeptoren. Moxonidin soll selektiver^[9,10,26,27,29,74] an I_1 binden als Clonidin. Clonidin soll weiterhin ein Agonist an I_2 -Imidazolinrezeptoren mit einer Affinität $I_1 > I_2$ ^[9,10,70,71] sein.

Über diese Rezeptoren, und über weitere Wirkmechanismen, wie Beeinflussung bestimmter $K^{+[23]}$ - und $Ca^{2+[76]}$ -Kanäle, können Moxonidin und Clonidin^[95] auf das Endothel, beziehungsweise auf die glatte Muskulatur, wirken. Weiter wird angenommen, dass bestimmte Substanzen aus der sehr großen Gruppe der Imidazol-/Imidazolin-Klasse eine hohe Affinität zu bestimmten NO-Synthasen haben. Es gibt Hinweise, dass alle Imidazol-Derivate mit der NOS-Häm-Gruppe durch die direkte Bindung an das Häm-Eisen interagieren können.^[6] Die Substanzen Moxonidin und Clonidin sind in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht worden.^[6]

Die Beeinflussung der NO-Synthase hätte eine Auswirkung auf die Produktion des wichtigsten vasorelaxierenden Substanz des Stickstoffmonoxid und damit von besonderer Wichtigkeit für die Gefäßveränderungen.

Die Gabe von 10^{-6} M Moxonidin als auch von Clonidin führt zu einer phasischen Kontraktion. In der Glukosekonzentration von 5,75 mM Glukose ist die Relaxation durch Acetylcholin gegenüber der Glukosekontrolle eingeschränkt. Im mikromolaren Bereich kommt es sowohl bei Moxonidin als auch bei Clonidin zu einer überlagerten Wirkung über α_1 -Rezeptoren.^[25] Über diese Rezeptoren wird eine Kontraktion eingeleitet, welche bei Moxonidin zu einer starken und bei Clonidin einer schwächeren Kontraktion nach Substanzgabe führt. Durch diese zusätzliche Komponente ist die Relaxation durch Acetylcholin eingeschränkt. Diese Einschränkung der Relaxation ist nicht additiv zur Relaxationsminderung durch Glukosebelastung. In der Konzentration von 10^{-7} M zeigt die Gabe von Moxonidin keine Wirkung auf das Gefäß. Die Eigenwirkung auf das Gefäß ist minimal und die Relaxation durch Acetylcholin gegenüber der Glukosekontrolle nicht beeinflusst. Die gegensätzliche Wirkung über α_1 - und präsynaptische α_{2A} -Rezeptoren sowie die Wirkung über Imidazolinrezeptoren scheinen ausgeglichen zu sein.

In der Konzentration von 10^{-7} M Clonidin lässt sich noch eine kontrahierende Wirkung nachweisen. Die Eigenwirkung auf das Gefäß zeichnet sich durch eine leichte Kontraktion aus, die in den 5,75 mM Glukose inkubierten Aortenringen signifikant höher ausfällt als in den 46 mM Glukose inkubierten Ringen.

Durch die Glukoseinkubation kommt eine relaxierende Komponente dazu. Die Relaxation durch Acetylcholin ist nach Gabe von 10^{-7} M Clonidin im Vergleich zur Glukosekontrolle eingeschränkt. Diese Einschränkung ist wie schon in der 10-fach höheren Konzentration (10^{-6} M) aber nicht additiv zur Relaxationsminderung durch die Glukosebelastung.

In der Konzentration von 10^{-8} M führt Moxonidin bei der Substanzgabe zu einer Relaxation von 8 %. Den direkten relaxierenden Effekt findet man allerdings nicht in der Relaxation durch Acetylcholin wieder. Die Gabe von 10^{-8} M Moxonidin führt zu einer eingeschränkten Relaxation durch Acetylcholin. Im Vergleich zur Kontrolle unter Glukosebelastung führt die Gabe von 10^{-8} M Moxonidin nicht zu einer weiteren Einschränkung der Relaxation. Die Einschränkung der Relaxation unter 5,75 mM Glukose haben wir nicht erwartet.

Hier sind weitere Untersuchungen zur Klärung notwendig. Hier sind Kontraktionsmechanismen vorstellbar die unabhängig von α -Rezeptoren wirken. Im Gegensatz dazu führt die Gabe von 10^{-8} M Clonidin zu einer verbesserten Relaxation unter Glukosebelastung in der Auswertung als Integral.

Clonidin zeigt bezüglich der α -Rezeptoren, je nach Modell, eine 2 - 10 Fach höhere Affinität als Moxonidin.^[25] Eine direkte hemmende Wirkung auf nikotinerge Ca^{2+} -Kanäle könnte nur bedingt eine Rolle spielen,^[76] da diese Wirkung in einer Konzentration von 10-100 μM gesehen wurde. Die blutdrucksenkende Wirkung von Moxonidin kann durch Vorbehandlung mit 6-Hydroxydopamin aufgehoben werden, nicht jedoch die Wirkung von Clonidin. Es wurde unter anderem gefolgert, dass diese Wirkung mit einer höheren Affinität zu präsynaptischen α_2 -Rezeptoren, die an nichtadrenergen Neuronen im Hirnstamm sitzen sollen, erklärt werden kann.^[25] Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Moxonidin im Vergleich zu Clonidin in der Wirkkonzentration schlechter auf präsynaptische α_2 -Rezeptoren wirkt, so dass die periphere Wirkung des Moxonidins durch verstärkte Wirkung auf postsynaptische α_2 -Rezeptoren die Relaxation durch Acetylcholin behindert.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der SHSP-Ratte, so findet man an isolierten Aortenringen der Ratte nach Gabe von isoeffektiven Konzentrationen von 10^{-7} M Moxonidin und 10^{-8} M Clonidin keine Verminderung der Relaxationseinschränkung unter 46 mM Glukose.

Eine Eigenwirkung in dieser Konzentration auf das Gefäß ist kaum vorhanden und mit den Ergebnissen der Versuche am Kaninchen vergleichbar. In der Aorta der SHSP-Ratte ist, so lässt sich vermuten, die Rezeptorverteilung für α_2 -Rezeptoren (vermutete prä- und postsynaptische) und gegebenenfalls Imidazolinbindungsstellen von der Aorta des Kaninchens verschieden.

Moxonidin führt an isolierten Aortenringen des Kaninchens zu einer Einschränkung der Relaxation unter 5,75 mM Glukose und keiner weiteren Einschränkung unter 46 mM Glukosebelastung.

Diese unveränderte Relaxation unter 46 mM Glukose kann im Modell der SHSP-Ratte ebenfalls bestätigt werden.

Eine Verbesserung der Relaxation wird an isolierten Aortenringen der SHSP-Ratte nicht gesehen, so dass wir davon ausgehen, dass das Ergebniss an isolierten Aortenringen des Kaninchens klinisch nicht relevant sind, zumal eine Einzelauswertung im Verhältnis keinen Zusammenhang vermuten lässt.

Die Imidazoline Moxonidin und Clonidin wirken in unterschiedlichen Konzentrationen relaxierend bis kontrahierend auf die isolierten Aortenringe.^[25] An Aortenringen der SHSP-Ratte lässt sich kein negativer Einfluss der untersuchten Imidazoline auf die Relaxation nachweisen.

An isolierten Aortenringen des weissen Neuseeländischen Kaninchens führt die Gabe von 10^{-8} bis 10^{-6} M Moxonidin und Clonidin zu keiner Einschränkung der Relaxation an den 46 mM glukosebelasteten Gefäßen. Unter 5,75 mM Glukose zeigt sich jedoch eine Einschränkung der Relaxation nach Gabe von Moxonidin in den Konzentrationen 10^{-6} und 10^{-8} M und Clonidin in den Konzentrationen 10^{-6} und 10^{-7} M.

Wir konnten an einem normalen und einem pathologisch veränderten Gefäßmodell zeigen, dass der Einsatz von sowohl Moxonidin als auch Clonidin, selbst in hohen Konzentrationen, in der Therapie des Diabetes mellitus keine bedenkliche Auswirkung auf das hyperglykämisch veränderte Gefäß hat.

Der Hauptwirkung dieser Substanzen, die über zentrale Imidazolin und α -Rezeptoren vermittelt wird, stehen keine peripheren Wirkungen unter Glukosebelastung entgegen.

4.3 Wirkung von Proteinkinase C an hyperglykämisch veränderten Gefäßen

Die Substanzen, welche die Eigenschaft der Hemmung der Proteinkinase C teilen, zeichnen sich dadurch aus, dass sie in eine Reihe von Vorgängen in der Zelle eingreifen können. Das liegt daran, dass die Proteinkinase C wie ein zentraler Regelmechanismus in eine Vielzahl von Vorgängen in der Zelle eingreift.^[81]

Die Untersuchung der einzelnen lokalen Wirkungen ist deshalb sehr wichtig, da neueste Erkenntnisse es absehbar werden lassen, dass Proteinkinase C-Hemmer bei verschiedenen Erkrankungen als Therapieansatz eingesetzt werden können. Hier sind Einsatzgebiete bei z.B. Augenerkrankungen mit Neovaskularisationsbildung^[21] und diabetischer Mikro- und Makroangiopathie vorstellbar. Die Untersuchung der lokalen Wirkung dieser Substanzen sind deshalb gerade am Gefäß sehr wichtig, weil das Gefäß beim Diabetes mellitus ein wichtiger und häufiger Ort für Schädigungen ist^[1,18,98,109] und kardiovaskuläre Komplikationen zu den schwersten Folgeerscheinungen zählen.^[58]

Hyperglykämie scheint die wichtigste Ursache der diabetischen Gefäßkomplikationen zu sein. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Glukosebelastung verbunden ist mit einer Proteinkinase C-Erhöhung.^[20,45,51,60] Diese Ergebnisse sind die Grundlage für unsere Überlegungen einer möglichen Beteiligung der Proteinkinase C bei Gefäßveränderungen im Sinne eines Remodeling und Ursache von Rezeptordysfunktionen nach einer Glukosebelastung. Eine mögliche Beteiligung der Phospholipase D und der PKC wurde für Gefäßhyperproliferation und Hypertrophie ausgelöst durch Glukosebelastung gezeigt.^[107] Die funktionellen Veränderungen dieser PKC-Erhöhung variieren von Aktivierung wichtiger Enzymsysteme, wie das der cPLA₂ und Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase bis zur verstärkten Expression verschiedener Zytokine.^[60]

Am vorkontrahierten Gefäß verstärken die PKC-Hemmer, Staurosporin und LY333531, die Relaxation, welche zum Teil aus der Hemmung kontraktile Elemente der Phenylephrinbedingten Kontraktion herrührt. Weiterhin wird der Ca^{2+} -Spiegel der Zelle verändert, welcher seinerseits auch schon Veränderungen der Kontraktion mit sich führt.

An der Aorta des weissen Neuseeländischen Kaninchens führen 100 nM Staurosporin zu einer verstärkten Relaxation durch Acetylcholin, welche einer vollständigen Abnahme der Kontraktion, der mit Phenylephrin vorkontrahierten Aortenringe, bewirkt. Ein Einfluss einer Inkubation in 46 mM Glukose ist nicht zu sehen. Die Proteinkinase C-Aktivitätserhöhung durch die Glukosebelastung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Relaxation.

In der Aorta der SHSP-Ratte führt Staurosporin ebenfalls zu einer verstärkten Relaxation, die im Vergleich zum weissen Neuseeländischen Kaninchen weniger ausgeprägt ist und durch die verstärkte Aktivierung des PKC-Systems bedingt ist. Die Relaxation durch Acetylcholin ist nach der Gabe von 100 nM LY333531 verstärkt. Diese Verstärkung ist so stark ausgeprägt, dass die durch Glukosebelastung eingeschränkte Relaxation durch Acetylcholin wieder aufgehoben wird, und sogar das Gefäß über das normale Niveau hinaus relaxiert.

Die Eigenwirkung der Substanz ist in den ersten 10 Minuten zwar stark ausgeprägt, nimmt aber mit der Zeit ab. Es gibt verschiedene Ursachen, die verantwortlich für die Relaxation sein können.

Als erste Ursache muss angeführt werden, dass der Kontraktionsmechanismus durch Phenylephrin zum Teil durch eine Proteinkinase C-Beteiligung zustande kommt. Khalil & al. sprechen hier von einem Anteil der Proteinkinase C an der Kontraktion bis maximal 30 %.^[50]

Die Kontraktionen von Aortenringen der SHSP-Ratte bei gleichzeitiger Gabe von Phenylephrin und dem PKC-Hemmer LY333531 und Kontraktionen bei alleiniger Gabe von Phenylephrin unterscheiden sich statistisch nicht. Proteinkinase C-Hemmer zeigen Ihre Wirkung durch Verstärkung der NOS-Aktivität.

Diese Aktivierung kann auf verschiedenen Ebenen geschehen, einerseits durch Veränderung der Ca^{2+} -Spiegel, da die Aktivität der NOS in der Kurzzeitregulation Ca^{2+} -abhängig ist. Ein erhöhter Ca^{2+} -Spiegel führt zu einer Aktivierung der NOS.^[99] Auf der anderen Seite besteht eine Regulation auf einer Transkriptionsebene. Die Promotorregion des iNOS-Genes enthält mehrere Bindungsstellen für Kernfaktoren NF- κ B und AP-1 (Jun/Fos).^[37] Paul & al. vermuten, dass an RAW 264.7 Makrophagen die PMA-sensitiven PKC-Formen (α , β und ϵ), und insbesondere die β - und ϵ -Isoformen, einen hemmenden Effekt auf die NOS haben.^[86] Ohara & al. bestätigen die Existenz für Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors AP-1 in der Promotorregion des ecNOS-Genes und bestätigen ebenfalls eine Steigerung der ecNOS-mRNA und Proteinmenge durch Staurosporin.^[82]

Die Relaxationsminderung der Gefäße durch Glukosebelastung beruht auf einer Proteinkinase C-Aktivierung. Durch die Gabe von LY333531 werden die pathologischen Veränderungen, welche durch die PKC-Aktivität hervorgerufen wurden, wiederhergestellt. Diese Verstärkung der Relaxation durch Glukosebelastung eingeschränkter Aortenringe, wird vor allem durch eine vermehrte NO-Abgabe vermittelt, welche aufgrund der erhöhten PKC-Aktivität vermindert war. Diese Ergebnisse geben einen weiteren Anhalt dafür, dass Veränderungen der Proteinkinase C-Aktivität in der Entwicklung chronischer diabetischer Gefäßkomplikationen eine Rolle spielen und dass es sinnvoll erscheint diese Substanzen in der Therapie einzusetzen um Gefäßkomplikationen positiv beeinflussen zu können.^[21,40]

4.4 Klinische Aussichten

Hyperglykämie ist eine der wichtigsten Ursachen in der Entwicklung von diabetischen Gefäßkomplikationen, wie Mikro- und Makroangiopathie. Die Hyperglykämie kann über verschiedene Regelmechanismen diese Erkrankungen beeinflussen. Einer dieser Mechanismen ist die Erhöhung der Proteinkinase C (PKC), welche durch eine Erhöhung des DAG-Pools hervorgerufen wird. Die Proteinkinase C kann ihrerseits eine Reihe von Gefäßregelmechanismen beeinflussen.^[82] Dazu gehören unter anderem die Modulation der zytosolischen Phospholipase A₂, der Na⁺-K⁺-ATPase^[60], die Genexpression der extrazellulären Matrix, einigen kontraktilen Elementen^[41] und der NO-Synthase.^[81] Es wird vermutet, dass Veränderungen der Proteinkinase C^[21] in der Regulierung des Sympathikotonus neben der Veränderung der Aktivität der NO-Synthase ein wichtiges Element in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt. Zu diesen Gefäßpathologien gehören zum Beispiel Veränderungen des retinalen und renalen Blutflusses, der Kontraktion, Permeabilität und Zellproliferation sowie Basalmembranveränderungen.^[41] Durch die Gabe von selektiven Proteinkinase C-Antagonisten kann möglicherweise in den pathophysiologischen Mechanismus effektiv eingegriffen werden und viele dieser pathologischen Veränderungen rückgängig gemacht werden.^[21,40] Der Einsatz von zentralwirksamen Antihypertonika, welche nach dem sympatholytischen Prinzip funktionieren, werden zur Zeit noch sehr vorsichtig eingesetzt. Dies scheint noch eine Folge aus der Zeit zu sein, als noch keine nebenwirkungsärmeren Antihypertensiva zur Verfügung standen. Neueste Erkenntnisse^[121] zeigen aber, dass gerade diese Medikamente in den pathophysiologischen Mechanismus^[44] eingreifen können, und durch ihren sympatholytischen^[23] Wirkmechanismus einen Vorteil für den Patienten bedeuten.^[29] So wird bei hypertensiven Diabetikern die Verabreichung dieser Substanzen empfohlen.^[54] Die Insulinresistenz macht die Therapie des Diabetes mellitus schwierig^[93] und hier greifen diese Substanzen an.^[62] Moxonidin, eine dieser Substanzen, zeigte in bestimmten Konzentrationen schon eine Besserung der Glukosetoleranz und Insulinresistenz.^[96]

Diese Eigenschaft wird jedoch bei der Substanz Clonidin durch direkte Wirkungen auf die β -Zellen des Pankreas wieder aufgehoben, zumindest eingeschränkt. Es gibt Berichte nach denen systemisch gegebenes Clonidin die Glukosetoleranz durch Minderung der Insulinausschüttung verschlechtert.^[33] Die beiden Substanzen Moxonidin und Clonidin scheinen sich in ihren α_2 -adrenergen (post- und ggf. präsynaptisch) und ihren Imidazolin-Eigenschaften so zu unterscheiden, dass bei Moxonidin die postsynaptischen α_2 -adrenergen Eigenschaften, die für die Hemmung der Insulinfreisetzung verantwortlich sind^[78] gegenüber vermuteten präsynaptischen α_2 , und nichtadrenergen, Imidazolin, Eigenschaften in den Hintergrund treten. Es gut vorstellbar, dass sympatholytische Medikamente bei der Therapie der Insulinresistenz^[62] und des Syndrom X eingesetzt werden. Neben der zentralen Wirkung dieser Substanzen sind Wirkungen über lokale Mechanismen denkbar wie zum Beispiel die Wirkung auf Gefäße, welche sich möglicherweise von der zentralen Wirkung dieser Medikamente unterscheiden. Unsere Untersuchungen zeigen, dass unter einer hyperglykämischen Umgebung eine Relaxation gegenüber einer entsprechenden Kontrolle nicht eingeschränkt ist. Weiterhin sollte die Wirkung dieser Substanzen auf endokrine Organe, insbesondere das Pankreas untersucht werden. Hier ist zur Zeit leider nur wenig Literatur verfügbar, jedoch gibt es Untersuchungen, nach denen Moxonidin in bestimmten Konzentrationen eine Insulinfreisetzung bewirken kann,^[16,44] Clonidin jedoch nicht.^[33] Diese Wirkung gilt allerdings nicht für alle Konzentrationen. Die zusätzliche antihypertensive Wirkung dieser Substanzen schränkt den Einsatzbereich ein wenig ein. So sollten hypotensive Diabetiker nur vorsichtig mit diesen Substanzen therapiert werden. Allerdings ist die Anzahl dieser Patienten schon aufgrund verschiedener Wirkmechanismen, welche eine hypertone Blutdrucklage herbeiführen, eher gering. Diese Substanzen greifen in einige der pathogenetischen Zusammenhänge zwischen dem Diabetes mellitus und dem arteriellen Hypertonus ein und könnten prophylaktisch eingesetzt werden, um eine Entwicklung oder Fortschreiten eines arteriellen Hypertonus zu vermeiden. Denn gerade die Kombination arterieller Hypertonus und Diabetes mellitus ist für den Tod vieler Patienten verantwortlich^[1,109,119] und könnte durch einen gemeinsamen therapeutischen Ansatz gelöst werden.

5 Zusammenfassung

Die diabetische Gefäßschädigung ist die Hauptursache für die Morbidität und Mortalität des Diabetes mellitus. Für die Genese dieser Veränderungen werden verschiedene Ursachen wie Hyperglykämie,^[103,118] arterielle Hypertonie und die Insulinresistenz diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Insulinresistenz und Glukosemetabolismus mit sympatholytischen Substanzen positiv beeinflusst werden können.^[22,54,62,96] Diese Wirkung wird überwiegend über zentrale Imidazolin- und α_2 -Rezeptoren vermittelt. Weiterhin haben wir die Wirkung des Proteinkinase C-Hemmers LY333531 untersucht, der in verschiedenen Methoden schon zeigen konnte, dass durch Hyperglykämie bedingte Gefäßeränderungen wiederhergestellt werden können.^[21,40] Deshalb haben wir in zwei verschiedenen etablierten in-vitro Relaxationsmodellen eine hyperglykämische Gefäßschädigung nachgestellt und Veränderung der Kontraktion und Relaxation isolierter Aortenringe unter dieser Umgebung untersucht. An isolierten Aortenringen des Kaninchens haben wir eine Wirkung einer Glukosebelastung auf die Kontraktion nicht gesehen. Wir haben daraufhin an Aortenringen der spontan hypertensiven Ratte die Inkubationszeiten variiert und konnten zeigen, dass nach einer Inkubation von 3 Stunden in einem hyperglykämischen Medium in Übereinstimmung mit der Literatur eine signifikante Zunahme der Kontraktion erfolgt. Nach 6 Stunden Inkubation ist an Aortenringen der SHSP-Ratte eine Zunahme der Kontraktionskraft nicht mehr nachweisbar. Die Schädigung durch die Inkubationszeit verändert nach langer Inkubation auch die Kontraktion. In Übereinstimmung mit der Literatur konnten wir sowohl an Aortenringen des Kaninchens als auch an Aortenringen der Ratte eine Einschränkung der acetylcholinbedingten endothelabhängigen Relaxation zeigen. Die Länge der Inkubation in einem hyperglykämischen Medium beeinflusst das Ausmaß der Relaxationseinschränkung. Eine Inkubation von Aortenringen der SHSP-Ratte nach 3 Stunden ist signifikant gegenüber einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden eingeschränkt. Nach 6 Stunden Inkubation ist die Relaxation gegenüber einer dreistündigen Inkubation weiter vermindert.

In höheren Konzentrationen nimmt die α - (α_2 und α_1) Wirkung der Imidazoline Clonidin und Moxonidin zu, so dass sich hier eine verstärkte eine substanzvermittelte Kontraktion zeigt. Unter normoglykämischer Umgebung führen beide Substanzen in hohen Konzentrationen so zu einer Einschränkung der Relaxation durch Acetylcholin. Nach Gabe von Moxonidin in den Konzentrationen von 10^{-6} und 10^{-8} M und nach Gabe von Clonidin in den Konzentrationen 10^{-6} und 10^{-7} M fiel die acetylcholinbedingte Relaxation vermindert aus. Wir konnten zeigen, dass in hyperglykämischer Umgebung die Relaxation durch Acetylcholin nach Gabe von Imidazolinen gegenüber der hyperglykämischen Kontrolle nicht eingeschränkt ist. Sowohl Moxonidin als auch Clonidin waren jedoch nicht in der Lage die glukosebedingte Einschränkung der Relaxation wiederherzustellen. Eine besonderes Verhältnis von α_2 -Rezeptoren (post sowie ggf. präsynaptisch) sowie möglicher Imidazolinrezeptoren sind für diesen Effekt wohl verantwortlich. Die Einschränkung der acetylcholinbedingten Relaxation der Aortenringe durch die Substanzen Clonidin und Moxonidin sind nicht additiv zur glukosebedingten Einschränkung der Relaxation. Staurosporin, ein PKC-Hemmer, hat an Aortenringen des Kaninchens eine Wiederherstellung der glukosebedingten Relaxationseinschränkung zeigen können. Die Relaxationskurven unter normo- und hyperglykämischer Bedingung unterscheiden sich aber nicht. Die Substanz LY333531, ein β -selektiver Proteinkinase C-Antagonist, ist in der Lage die hyperglykämisch bedingten Relaxationsminderungen wiederherzustellen. Diese Verstärkung der Relaxation durch Glukosebelastung eingeschränkter Aortenringe, wird möglicherweise durch eine vermehrte NO-Abgabe vermittelt, indem die erhöhte PKC-Aktivität durch den Antagonismus, insbesondere des PKC- β -Isoenzyms, vermindert wird, welche über Kernfaktoren wie AP-1 und NF- κ B die ecNOS-RNA und Proteinmenge steigern soll.^[82] Diese Ergebnisse geben einen weiteren Anhalt dafür, dass Veränderungen der Proteinkinase C-Aktivität in der Entwicklung chronischer diabetischer Gefäßkomplikationen eine wichtige Rolle spielen und dass Möglichkeiten bestehen könnten, diese Substanzen in der Therapie einsetzen zu können um diabetische Gefäßveränderungen positiv zu beeinflussen.^[21,40]

Weiterhin sind die Imidazoline Moxonidin und Clonidin geeignet in der Therapie des Diabetes mellitus, da sie zentral sympatholytisch wirken und eine Insulinresistenz positiv beeinflussen können ohne dass periphere Wirkungen dieser Substanzen unter einer hyperglykämischen Umgebung bestehen, die der zentralen Wirkung gegenübersteht.

6 Danksagung

Hiermit möchte ich den Firmen Eli Lilly und Beiersdorf AG für Ihre Unterstützung während meiner Arbeit danken.

Ebenso gilt der Dank den Mitarbeitern der Lilly Research Laboratories, die mich in der täglichen Arbeit unterstützt haben und mir mit Rat und Tat beiseite standen.

Insbesondere möchte ich mich bei Prof. Dr. Mest für die Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit bedanken.

7 Literaturverzeichnis

¹Adler A., Neil A.W., Manley S., Holman R., Turner R.,
Hyperglycemia and hyperinsulinemia at diagnosis of diabetes and their association with subsequent cardiovascular disease in the United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS 47)
Am. Heart Journal **1999** , 138 : 353-359

²Andrea J. E., Walsh M. J.
Protein kinase C of smooth muscle
Hypertension **1992** , 20 : 585-595

³Archibald V., Cotter M. A., Keegan A., Cameron N.E.
Contraction and relaxation of aortas from diabetic rats: effects of chronic anti-oxidant and aminoguanidine treatments
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. **1995** , 53 : 584-591

⁴Ashkenazi A., Winslow J. W., Peralta E. G., Peterson G. L., Schimerlik M. I.I., Capon D. , Ramachandran J.
An M₂ muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover
Science **1987** , 238 : 672 - 675

⁵Bazan E., Campbell AK., Rapoport RM.
Protein kinase C activity in blood vessels from normotensive and spontaneously hypertensive rats
Eur. J. Pharm. **1992** , 22 : 345-348

⁶Berka V., Palmer G., Chen PF., Tsai AL.
Effects of various imidazole ligands on heme conformation in endothelial nitric oxide synthase
Biochemistry **1998** , 37 : 6136-6144

⁷Bilder GE, Kasiewski CJ, Perrone MH
Phorbol-12,13-dibutyrate- induced vasoconstriction in vitro: characterization of responses in genetic hypertension
J. Pharmacol. Exp. Ther. **1990** , 252 : 526-530

⁸Boulanger C. M., Morrison K. J. and Vanhoutte P. M.
Mediation by M₃-muscarinic receptors of both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholin in the aorta of the spontaneously hypertensive rat
Br. J. Pharmacol. **1994** , 112 : 519 - 524

⁹Bousquet P.

Recent advances in imidazoline receptor research

Exp. Opin. Invest. Drugs **1995** , 4 : 431 - 442

¹⁰Bousquet P., Feldman J. and Schwartz J.

Central cardiovascular effects of α -adrenergic drugs : Difference between catecholamines and imidazolines

J. Pharmacol. Exp. Therap. **1984** , 230 : 232 - 236

¹¹Bousquet P., Feldman J., Bloch R., Schwartz J.

The nucleus reticularis lateralis: a region highly sensitive to clonidine.

Eur. J. Pharmacol. **1981** , 69 : 389-392

¹²Brands M W., Hopkins T E.

Poor glycemic control induces hypertension in diabetes mellitus

Hypertension **1996** , 27 : 735 - 739

¹³Brownlee M., Cerami A., Vlassara H.

Advanced glycolysation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications.

N. Eng. J. Med. **1988** , 318 (suppl20) : 1315-1321

¹⁴Bylund DB., Eickenberg DC., Hieble JP., Langer SZ., Lefkowitz RJ., Minneman KP., Molinoff PB., Ruffolo RR., Trendelenburg U.

International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors

Pharmacol. Rev. **1994** , 46 (2) : 121-135

¹⁵Chakravarthy U., Hayes RG., Stitt AW., McAuley E., Archer DB.

Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycolysation end products

Diabetes **1998** , 47 : 945-952

¹⁶Chan SLF., Brown CA., Scarpello KE., Morgan NG.

The imidazoline site involved in control of insulin secretion: characteristics that distinguish it from I_1 and I_2 sites

Br. J. Pharmacol. **1994** , 112 : 1065-1070

¹⁷Chrisp P., Faulds D.

Moxonidine : A review of its pharmacology and therapeutic use in essential hypertension

Drugs **1992** , 44 : 993 – 1012

¹⁸Clark CM., Perry RC.

Type 2 diabetes and macrovascular disease :Epidemiology and etiology

Am. Heart J. **1999** , 138 : 330-333

¹⁹Cosentino F., Hishikawa K., Katusic ZS., Lüscher TF.

High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells

Circulation **1997** , 96 : 25-28

²⁰Craven PA., Davidson CM., DeRupertis FR.

Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids

Diabetes **1990** , 39 : 667-674

²¹Danis RP., Bingaman DP., Jirousek M., Yang Y.

Inhibition of intraocular neovascularisation caused by retinal ischemia in pigs by PKC-beta inhibition with LY333531

Invest. Ophthalmol. Vis- Sci. **1998** , 39 : 171-179

²²Donnelly R., Qu X.

Mechanisms of insulin resistance and new pharmacological approaches to metabolism and diabetic complications

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **1998** , 25 : 79-87

²³Dunne MJ., Harding EA., Jaggar JH., Squires PE., Liang R., Kane C., James RFL., London NJM.

Potassium channels, imidazolines and insulin-secreting cells

Ann. N. Y. Acad. Sci. **1995** , 763 : 243 -261

²⁴Epstein M., Sowers JR.

Diabetes mellitus and hypertension

Hypertension **1992** , 19 : 403 - 418

²⁵Ernsberger P., Elliott HL., Weimann HJ., Raap A., Haxiu MA., Hofferber E., Löw-Kröger A., Reid JL., Mest HJ.

Moxonidine : A second-generation central antihypertensive agent

Cardiovasc. Drug Rev. **1993** , 11 : 411-431

²⁶Ernsberger P., Damon TH., Graff LM., Schäfer SG., Christen MO

Moxonidine , a centrally acting antihypertensive agent, is a selective ligand for I₁-imidazoline sites

J. Pharmacol. Exp. Therap. **1993** , 264 : 172 - 182

²⁷Ernsberger P., Giuliano R., Willette RN. and Reis DJ.

Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostral ventrolateral medulla

J. Pharmacol. Exp. Therap. **1990** , 253 : 408 - 418

- ²⁸Ernsberger PR., Meeley MP., Mann JJ., Reis DJ.
Clonidine binds to imidazole binding sites as well as α_2 -adrenoceptors in the ventrolateral medulla.
Eur. J. Pharm. **1987** , 134 : 1-13
- ²⁹Ernsberger P., Friedman JE., Kotletsky RJ.
The I_1 -Imidazoline receptor : from binding site to therapeutic target in cardiovascular disease
Hypertension **1997** , 15 (Suppl 1) : 9-23
- ³⁰Feletou M., Rasetti C., and Duhault J.
Magnesium modulates endothelial dysfunction produced by elevated glucose incubation
J. Cardiovasc. Pharmacol. **1994** , 24 : 470 - 478
- ³¹Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K.
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Spektrum Akad. Verl. **1996** : 7. Auflage
- ³²Furchgott RF. und Zawadzki JV.
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine
Nature **1980** , 288 : 373 - 376
- ³³Garcia-Barrado MJ., Sancho C., Palomero J., Moratinos J.
Role of α -2-adrenoceptors on the hyperglycaemic and insulin secretory effects derived from α -1- and β -adrenoceptor stimulation in the rabbit.
J. of Auton. Pharmacol. **1998** , 18 : 287-295
- ³⁴Göthert M. and Molderings GJ.
Involvement of presynaptic imidazoline receptors in the α_2 -adrenoceptor-independent inhibition of noradrenaline release by imidazoline derivatives
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol **1991** , 343 : 271 - 282
- ³⁵Göthert M. and Molderings GJ.
Modulation of norepinephrine release in blood vessels: Mediation by presynaptic imidazoline receptors and α_2 -adrenoceptors
J. Cardiovasc. Pharmacol. **1992** , 20 (Suppl. 4) : 16 - 20
- ³⁶Hattori Y., Kawasaki H., Fukao M., Kanno M.
Phorbol esters elicit Ca^{2+} -dependent delayed contraction in diabetic rat aorta
Eur. J. Pharmacol. **1995** , 279 : 51 - 58

- ³⁷Hecker M., Preiß C., Schini-Kerth VB.
Induction by staurosporine of nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells: role of NF- κ B, CREB and C/EBP β
Br. J. Pharmacol. **1997** , 120 : 1067-1074
- ³⁸Hug H., Sarre T.F.
Protein kinase C isoenzymes : divergence in signal transduction ?
Biochem. J. **1993** , 291 : 329-343
- ³⁹Inoguchi T., Battan R., Handler E., Sportsman JR., Heath W. and King GL.
Preferential elevation of protein kinase isoform C β_2 and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: Differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation
Proc. Natl. Acad. Sci. **1992** , 88 : 11059- 11063
- ⁴⁰Ishii H., Jirousek M J., Koya D., Takagi C., Xia P., Clermont A., Bursell SE., Kern T S., Ballas LM., Heath WF., Stramm L E., Feener EP. , King GL.
Amelioration of vascular dysfunction in diabetic rats by an oral PKC β - inhibitor
Science **1996** , 272 : 728-731
- ⁴¹Ishii H., Koya D., King GL.
Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus.
J. Mol. Med. **1998** , 76 : 21-31
- ⁴²Jaiswal N ., Lamprecht G., Mutschler E., Tacke R .,Malik KU.
Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta
J. Pharmacol. Exp. Ther. **1991** , 258 : 842-850
- ⁴³Jirousek MR. , Gillig JR., Gonzales CM.,Heath WF., McDonald JH., Neel DA., Rito CJ., Singh U., Stramm LE., Badalian AM., Baevsky M., Ballas LM., Hall SE., Winneroski LL. and Faul MM.
(S)-13-[(Dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16,21 - dimetheno[1H,13H-dibenzo(e, k)pyrrolo (3,4,-h) (1,4,13) oxadiazacyclohexadecene-1,3 (2H)-dione (LY333531) and related analogues: Isozyme selective inhibitors of protein kinase C β
J. Med. Chem. **1996** , 39 : 2664-2471
- ⁴⁴Kaan EC., Brückner R., Frohly P., Tulp M., Schäfer SG., Ziegler D.
Effects of agmatine and moxonidin on glucose metabolism: an integrated approach towards pathophysiological mechanisms in cardiovascular metabolic disorders.
Cardiovasc. Risk Factors **1995** , 5 (suppl 1) : 19-27

- ⁴⁵Kaiser N., Sasson S., Feener EP., Moller DE., King GL.
Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells.
Diabetes 1992 , 42 : 80-89
- ⁴⁶Kanazawa K., Kawashima S., Mikami S., Miwa Y., Hirata K., Suematsu M., Hayashi Y., Itoh H., Yokohama M.
Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation
Am. J. Pathology 1996 , 148 : 1949-1956
- ⁴⁷Kannel WB.
Fifty years of Framingham study contributions to hypertension
J. Hum. Hypertension 2000 , 14 : 83-90
- ⁴⁸Kato T., Iwama Y., Okumura K., Hashimoto H., Ito T. and Satake T.
Prostaglandin H₂ may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat
Hypertension 1990 , 15 : 475 - 481
- ⁴⁹Kauser K., Rubanyi GM.
Gender difference in endothelial dysfunction in the aorta of spontaneously hypertensive rats
Hypertension 1995 , 25 : 517 - 523
- ⁵⁰Khalil RA., Breemen v. C.
Sustained contraction of vascular smooth muscle : Calcium influx or C-kinase activation
J. Pharmacol. Exp. Therap. 1987 , 244 : 537-542
- ⁵¹King GL. , Kunisaki M., Nishio Y., Inoguchi T., Shiba T. and Xia P.
Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications
Diabetes 1996 , 45 (Suppl 3) : 105- 108
- ⁵²Kobilka BK., Matsui H., Kobilka TS., Yang-Feng TL., Franke U., Caron MG., LefkowitzRJ., Regan JW.
Cloning , sequencing and expression of the gene coding for the human platelet α_2 -adrenergic receptor
Science 1987 , 238 : 650-656

- ⁵³Komuro I., Katoh Y., Kaida T., Shibasaki Y., Kurabayashi M., Hoh E., Takaku F., Yazaki Y.
Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes.
J. Biol. Chem. **1991** , 266 : 1265- 1268
- ⁵⁴Krentz AJ., Evans AJ.
Selective imidazoline receptor agonists for metabolic syndrome
Lancet **1998** , 351 : 152-153
- ⁵⁵Kumar AM., Gupta RK., Spitzer A.
Intracellular sodium in proximal tubulus of diabetic rats: Role of glucose.
Kidney Int. **1988** , 33: 792-797
- ⁵⁶Küng CF., Lüscher T. F.
Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta
Hypertension **1995** , 25 : 194 - 200
- ⁵⁷Kunisaki M., Fumio U., Nawata H., King GL.
Vitamin E normalizes diacylglycerol-protein kinase C activation induced by hyperglycemia in rat vascular tissues
Diabetes **1996** , 45 (Suppl 3) : 117 - 119
- ⁵⁸Laakso M.
Hypertension and macrovascular disease- the killing fields of NIDDM
Diabetes Res. Clin. Pract. **1998** , 39 : 29-33
- ⁵⁹Lachuaud-Pettiti V., Podevin RA., Chretien I., Parini A.
Imidazoline-guanidinium receptive sites in basolateral membranes from human kidney.
Eur. J. Pharmacol **1991** , 206 : 23-31
- ⁶⁰Lee TS., MacGregor LC., Fluharty SJ., King GL.
Differential regulation of protein kinase C and Na,K-adenosine triphosphate activities by elevated glucose levels in retinal capillary endothelial cells
J. Clin. Invest. **1989** , 83 : 90-94
- ⁶¹Limon I., Couprie I., Lanier SM., Parini A.
Purification and characterization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive sites from rabbit kidney
J. Biol. Chem. **1992** , 267 : 21645- 21649

- ⁶²Lithell HO.
Considerations in the treatment of insulin resistance and related disorders with a new sympatholytic drug
Hypertension **1997** , 15 (suppl 1) : 39-42
- ⁶³Lois JC., Magal E., Yavin E.,
Protein kinase C alteration in the foetal rat brain after global ischemia.
J. Biol. Chem. **1988** , 263 : 19282-19285
- ⁶⁴Lomasney JW., Lorenz W., Allen LF., King K., Regan JW., Yang-Feng TL., Caron Mg., Lewkowitz RJ.,
Expansion of the α_2 -adrenergic receptor family: cloning and expression of a human α_2 -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosom 2
Proc Natl. Acad. Sci. **1990** , 87 : 5094-5098
- ⁶⁵Lorenzi M., Caliero E., Toledo S.
Glucose toxicity for human endothelial cells in culture: Delayed replication, disturbed cell cycle and accelerated death.
Diabetes **1985** , 43 : 621-627
- ⁶⁶Massa G., Ingemanson R., Sjöberg T., Steen S.
Endothelium-dependent relaxation after short- term preservation of vascular grafts
Ann. Thorac. Surg. **1994** , 58 : 1117-1122
- ⁶⁷Matsuda K., Sekiguchi F., Tojo M., Shimamura K. and Sunano S.
Effects of N^G-nitro-L-arginine on α -agonists-induced contraction of aorta from Wistar Kyoto rats and stroke prone sponaneously hypertensive rats
J. Smooth Muscle Res. **1995** , 31 : 51 - 60
- ⁶⁸Matsumoto H., Sasaki Y.
Staurosporine , a protein kinase C inhibitor, interferes with proliferation of arterial smooth muscle cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **1989** , 158 : 105-109
- ⁶⁹Michaelis D., Jutzi E.
Epidemiology of diabetes mellitus in the population of the former DDR: age and gender specific trends in the incidence and prevalence during 1960-1987
Z. klin. Med. **1991** , 1 : 59-64
- ⁷⁰Michel MC., Ernsberger P.
Keeping an eye on the I site : Imidazoline preferring receptors
Trends Pharmacol. Sci. **1992** , 13 : 369 - 370

⁷¹Michel MC., Insel PA.

Are there multiple imidazoline binding sites ?

Trends Pharmacol. Sci. **1989** , 10 : 342 - 344

⁷²Molderings G. J., Hentrich F. and Göthert M.

Pharmacological characterization of the imidazoline receptor which mediates inhibition of noradrenaline release in the rabbit pulmonary artery

Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. **1991** , 344 : 630 - 638

⁷³Molderings G.J. and Göthert M.

Inhibitory presynaptic imidazoline receptors on sympathetic nerves in the rabbit aorta differ from I₁- and I₂-imidazoline binding sites

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **1995** , 351: 507 - 516

⁷⁴Molderings G.J., Göthert M., Christen O. und Schäfer SG.

Imidazolrezeptoren und Blutdruckregulation Hohe Rezeptorselektivität von Moxonidin

Dtsch med. Wochenschr. **1993** , 118 : 953 - 958

⁷⁵Muramatsu I., Ohmura T., Kigoshi S., Hashimoto S., Oshita M.

Pharmacological subclassification of α_1 -adrenoceptors in vascular smooth muscle

Br. J. Pharmacol. **1990** , 99 : 197-201

⁷⁶Musgrave IF., Krautwurst D., Hescheler J., Schultz G.

Clonidine and cirazoline inhibit activation of nicotinic channels in PC-12 cells

Ann. N.Y. Acad. Sci. **1995** , 763 : 272-282

⁷⁷Myers PR., Minor RL. Jr., Guerra R Jr., Bates JN., Harrison DG.

Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocystein than nitric oxide.

Nature **1990** , 345 : 161-163

⁷⁸Nakaki T., Nakadate T., Ishii K., Kato R.

Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors in isolated rat islets of Langerhans: inhibition of insulin release and cyclic 3'-5'-adenosine monophosphate accumulation

J. Pharmacol. Exp. Ther. **1981** , 216 : 607-612

⁷⁹NishioY., Warren C., Buczek-Thomas JA., Ruhls J., Aiello LP., Feener EP., Miller TB., Dennis JW., King GL.

Identification, cloning and characterization of diabetes and hyperglycemia-induced genes in rat cardiac tissue using mRNA differential display

J. Clin. Invest **1995** , 96 : 1759-1767

⁸⁰ Nishizuka Y.

Studies and perspectives of protein kinase C

Science **1986** , 233 : 305 - 312

⁸¹Nishizuka Y.

Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C

Science **1992** , 258 : 607-614

⁸²Ohara Y., Sayegh HS., Yamin J., Harrison DG.

Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthetase by protein kinase C

Hypertension **1995** , 25 : 415 - 420

⁸³Ono Y., Fujii T., Ogita K., Kikkawa U., Igarashi K., Nishizuka Y.

The structure, expression and properties of additional members of protein kinase C family.

J. Biol. Chem. **1988** , 263 : 6927-6932

⁸⁴Palmer RMJ., Ashton DS., Moncada S.

Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-Arginin

Nature **1988** , 333 : 664-666

⁸⁵Palmer RMJ., Ferrige AG., Moncada S.

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium -derived relaxing factors

Nature **1987** , 327 : 524-526

⁸⁶Paul A., Doherty K., Plevin R.

Differential regulation by protein kinase C isoforms of nitric oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages and rat aortic smooth muscle cells

Br. J. Pharmacol. **1997** , 120 : 940-946

⁸⁷Pepke-Zaba J., Higginbottom TW., Dinh-Xuan T., Ridden C., Kealey T.

a -adrenoceptor stimulation of porcine pulmonary arteries

Eur. J. Pharmacol. **1993** , 235 : 169-175

⁸⁸Pieper GM. , Maier DA. , Hager SR.

Endothelial dysfunction in a model of hyperglycemia and hyperinsulinemia

Am. J. Physiol. **1995** , 269 : 845- 850

⁸⁹Pirat J.

Diabetes mellitus and its degenerative complications : a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973.

Diabetes Care **1978** , 1 : 168-188

⁹⁰Quyyumi AA.

Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease.

Am. J. Med **1998** , 105 : 32-39

⁹¹Rapoport RM., Williams SP.

Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contractions of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats

Hypertension **1996** , 28 : 64 - 75

⁹²Raymond JR., Hnatowich M., Lefkowitz R J. and Caron MG.

Adrenergic receptors : Models for regulation of signal transduction processes

Hypertension **1990** , 15 : 119 - 131

⁹³Reaven GM.

Banting lecture 1988 : Role of insulin resistance in human disease

Diabetes **1988** , 37 : 1595-1607

⁹⁴Regan JW., Kobilka TS., Yang-Feng TL., Caron Mg., Lewkowitz RJ., Kobilka BK.

Cloning and expression of a human kidney cDNA for an α_2 -adrenergic receptor subtype

Proc Natl. Acad. Sci. **1988** , 85 : 6301-6305

⁹⁵Regunathan S., Evinger MJ., Meeley MP. and Reis DJ.

Effects of clonidine and other imidazole-receptor binding agents on second messenger systems and calcium influx in bovine adrenal chromaffine cells

Biochem. Pharmacol. **1991** , 42 : 2011 - 2018

⁹⁶Rösen P., Ohly P., Gleichmann H.

Experimental benefit of moxonidine on glucose metabolism and insulin secretion in the fructose-fed rat.

Hypertension **1997** , 15 (suppl 1) : 31-38

⁹⁷Roy S., Sala R., Caligero E., Lorenzi M.

Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: Phenomenon with a memory

Proc. Natl. Acad. Sci. **1990** , 87 : 404-408

⁹⁸Salomaa V., Riley W., Kark J. D., Nardo C. and Folsom AR.

Non-insulin-dependent diabetes mellitus and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness indexes: The ARIC Study

Circulation **1995** , 91 : 1432 - 1443

- ⁹⁹Schini-Kerth VB., Vanhoutte PM.
Nitric oxide Synthase in vascular cells
Ann. Med. **1995** , 27 : 331-340
- ¹⁰⁰Sekiguchi K., Tsukuda M., Ase K., Kikkawa U., Nishizuka Y.
Mode of action and kinetic properties of three distinct forms of protein kinase C from rat brain.
J. Biochem. **1988** , 103 : 759-765
- ¹⁰¹Silva E. G., Feres T., Vianna L. M., Okuyama P. and Paiva T. B.
Dual effect of clonidine on mesenteric artery adrenoceptors: Agonistic (alpha-2) and antagonistic (alpha-1)
J. Pharmacol. Exp. Ther. **1996** , 277 : 872 - 876
- ¹⁰²Szabo B., Urban R., Limberger N. and Starke K.
Cardiovascular effects of agmatine , a „clonidine-displacing substance“ in consciuos rabbits
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol **1995** , 351 : 268 - 273
- ¹⁰³Tesfamariam B., Brown M. L., and Cohen R. A.
Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C
J. Clin. Invest. **1991** , 87 : 1643 - 1648
- ¹⁰⁴Tesfamariam B., Brown M. L., Deykin D., and Cohen R. A.
Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta
J. Clin. Invest. **1990** , 85 : 929 - 932
- ¹⁰⁵Tesfamariam B., Jakubowski J. A. and Cohen R. A.
Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TxA₂
Am. J. Physiol. **1989** , 257 : 1327 - 1333
- ¹⁰⁶Testa R., Guarneri L., Poggesi E., Simonazzi I., Taddei C. and Leonardi A.
Mediation of noradrenalin-induced contractions of rat aorta by the α_{1b} -adrenoceptor subtype
Br. J. Pharmacol. **1995** , 114 : 745 - 750
- ¹⁰⁷**The Diabetes Control and Complication Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long - term complications in insulin dependent diabetes mellitus**
N. Eng. J. Med. **1993** , 329 : 1390-1398

¹⁰⁸Tian WN., Gupta S., Deth RC.

Species differences in chloroethylclonidine antagonism at vascular α_1 adrenergic receptors

J. Pharmacol. Exp. Ther. **1990** , 253 : 877-883

¹⁰⁹Turner R.

Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)

Lancet **1998** , 352 : 837-853

¹¹⁰Uematsu M., Ohara Y., Navas JP., Nishida K., Murphy TJ., Alexander RW., Nerem RM., Harrison DG.

Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress

Am. J. Physiol. **1995** , 269 : 1371-1378

¹¹¹Upchurch GR., Welch GN., Freedman JE., Fabian AJ., Pigazzi A., Scribner AM., Alpert CS., Keaney JF., Loscalzo J.

High-dose heparin decreases nitric oxide production by cultured bovine endothelial cells

Circulation **1997** , 95 : 2115-2121

¹¹²Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martasek P., Hogg N., Mastes BS., Karoui H., Tordo P., Pritchard KA . Jr.

Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase : The influence of cofactors

Proc. Natl. Acad. Sci. **1998** , 95 : 9220-9225

¹¹³Weidmann P., Ferrari P.

Central role of sodium in hypertension in diabetic subjects.

Diabetes Care **1991** , 14 : 220-232

¹¹⁴Wilcox JN., Subramanian RR., Sundell CL., Tracey WR., Pollock JS., Harrison DG., Marsden PA.

Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels

Arterioscler. Thromb. Vasc Biol **1997** , 17 : 2479-2488

¹¹⁵Williamson JR., Chang K., Frangos M., Hasan KS., Ido Y., Kawamura T., Nyengaard JR. van-den-Enden M., Kilo C., Tilton RG.

Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications

Diabetes **1993** , 42 : 801-813

- ¹¹⁶Wirth K. J., Linz W., Wiemer G. and Schölkens B. A.
Differences in acetylcholine- and bradykinin-induced vasorelaxation of the mesenteric vascular bed in spontaneously hypertensive rats of different ages
 Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. **1996** , 354 : 38 - 43
- ¹¹⁷Xia Pu, Inoguchi T., Kern T. S., Engerman R. L., Oates P. J., and King G.L.
Characterisation of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia
 Diabetes **1994** , 43 : 1122 - 1129
- ¹¹⁸Yasunari K., Kohno M., Kano H., Yokokawa K., Horio T., Yoshikawa J.
Possible involvement of phospholipase D and protein kinase C in vascular growth induced by elevated glucose concentration
 Hypertension **1996** , 28 : 159-167
- ¹¹⁹Yokoyama S., Korthuis R. J., Benoit J. N.
Hypoxia-reoxygenation impairs endothelium-dependent relaxation in isolated rat aorta
 Am. J. Physiol. **1996** , 270 : 1126- 1131
- ¹²⁰Zavaroni J., Bonora E., Pagliara M., Dall'Aglio E., Luchetti L., Buonanno G., Bonati PA.
Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance.
 N. Eng. J. Med. **1989** , 320 : 702-706
- ¹²¹Zwieten van PA.
Centrally acting antihypertensives: a renaissance of interest. Mechanisms and haemodynamics
 Hypertension **1997** , 15 : 3-8

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am : 03.07.2001

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität Hamburg : 11.12.2001

Dekan : Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent : Prof. Dr. H.-J. Mest

Korreferent : Prof. Dr. H. Scholz

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Jahr und Auflage des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg den 30.09.2000

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Florian A. Szabados
Adresse	Möhlendannen 47 22391 Hamburg
Geburtsdatum/Ort	21.12.1971 in Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Bildungsgang

06 / 1991	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Grootmoor (Hamburg)
10 / 1993	Ärztliche Vorprüfung, Universität Hamburg
10 / 1994	1. Staatsexamen , Universität Hamburg
10 - 12 / 1994	Praktikum Institut für Mikrobiologie Universität Hamburg
9 / 1995	Labortätigkeit Abteilung für Chirurgie der Universitätsklinik Fukuoka (Japan)
12 / 1995	Beginn der Dissertation
10 / 1997	2. Staatsexamen , Universität Hamburg
11 / 1998	3. Staatsexamen , Universität Hamburg

Arzt in Weiterbildung

01.04.1999 - 30.09.1999

Abteilung für Klinische Radiologie im Gefäßzentrum des
Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Harburg

01.10.1999 - 30.09.2000

Zentrum für Innere Medizin am Universitätsklinikum
Essen

3/2001-

Institut für Labor und Transfusionsmedizin des
Herzzentrums Nordrheinwestfalen, Universitätsklinik
Bochum

Hamburg den 1.05.2001

8 Anhang

weisses neuseeländisches Kaninchen			Mol/l Acetylcholin									AUC		
		mN	2* -9	7* -9	2* -8	7* -8	2* -7	7* -7	2* -6					
Glukose	46 mM	34.53	-0.01	-0.06	-0.17	-0.44	-0.57	-0.57				152.18		152.18
n=21 (13)	SEM	1.86	0.01	0.01	0.02	0.03	0.03	0.04		SEM	9.59			9.59
		p-Werte	0.01w	0.001w	0.001	0.010	0.019w	0.045w		p-Werte	0.01			
Glukose	5,75 mM	35.71	-0.053	-0.123	-0.267	-0.494	-0.645	-0.647					186.11	
n=23 (12)	SEM	2.64	0.012	0.0195	0.0309	0.0335	0.0309	0.0373					11.73	
		p-Werte	0.098	0.006	0.001	0.001	0.140	0.640		p-Werte	0.01			0.96
Glukose	11,5 mM	35.71	-0.03	-0.06	-0.16	-0.40	-0.60	-0.63	-0.64			152.69		
n=16 (4)	SEM	2.84	0.02	0.05	0.03	0.04	0.06	0.07	0.10	SEM	15.59			
Substanz-														
kontraktion														
Moxonidin														
10 -6 M	5,75 mM	0.36	-0.03	-0.07	-0.14	-0.33	-0.50	-0.54	-0.45			133.07		
n=16(3)	SEM	0.05	0.02	0.02	0.03	0.06	0.07	0.08	0.09	SEM	19.06			
		p-Werte	0.5w	0.71	0.35	0.07	0.20	0.35w	0.28	p-Werte	0.11		0.00	0.67
	46 mM	0.29	-0.05	-0.07	-0.15	-0.39	-0.55	-0.57	-0.49			148.02		
n=15(3)	SEM	0.06	0.02	0.02	0.03	0.06	0.07	0.07	0.08	SEM	15.85			
10 -7 M	5,75 mM	0.02	-0.06	-0.13	-0.24	-0.50	-0.66	-0.64	-0.38			189.12		
n=17(3)	SEM	0.02	0.02	0.05	0.10	0.09	0.07	0.07	0.07	SEM	32.85			
		p-Werte	0.001w	0.04	0.06	0.41	0.02	0.00	0.01	0.85	p-Werte	0.16	0.08	0.62
	46 mM	-0.03	-0.03	-0.08	-0.16	-0.40	-0.55	-0.54	-0.39			147.27		
n=17(4)	SEM	0.01	0.02	0.03	0.03	0.05	0.06	0.07	0.08	SEM	14.82			
10 -8 M	5,75 mM	-0.08	-0.05	-0.10	-0.16	-0.35	-0.54	-0.54	-0.41			147.07		
n=15(4)	SEM	0.03	0.03	0.05	0.06	0.08	0.08	0.09	0.12	SEM	28.40			
		p-Werte	0.01w	0.01w	0.81w	0.42	0.89	0.74	0.12	p-Werte	0.47		0.01	0.18
	46 mM	-0.08	-0.02	-0.05	-0.14	-0.38	-0.54	-0.52	-0.51			137.87		
n=17(4)	SEM	0.05	0.01	0.03	0.03	0.05	0.07	0.09	0.05	SEM	16.95			

w = Whitney Mann Rang summen Test

weisses Neuseeländisches Kaninchen			Mol/l Acetylcholin								AUC		
mN			2* -9	7* -9	2* -8	7* -8	2* -7	7* -7	2* -6				
Glukose n=23 (12)	5,75 mM	34.53	-0.053	-0.123	-0.267	-0.494	-0.645	-0.647		152.18		152.18	
	SEM	1.86	0.012	0.0195	0.0309	0.0335	0.0309	0.0373		9.59		9.59	
		p-Werte	0.01w	0.001w	0.001	0.010	0.019w	0.045w		p-Werte	0.01		
Glukose n=21 (13)	46 mM	35.71	-0.01	-0.06	-0.17	-0.44	-0.57	-0.57			186.11		
	SEM	2.64	0.01	0.01	0.02	0.03	0.03	0.04			11.73		
		p-Werte	0.098	0.006	0.001	0.001	0.140	0.640		p-Werte	0.01	0.960	
Glukose n=16 (4)	11,5 mM	35.71	-0.03	-0.06	-0.16	-0.40	-0.60	-0.63	-0.64	152.69			
	SEM	2.84	0.02	0.05	0.03	0.04	0.06	0.07	0.10	15.59			
Substanz- kontraktion													
Clonidin 10 -6 M n=15(3)	5,75 mM	0.11	-0.04	-0.09	-0.13	-0.34	-0.47	-0.52	-0.35	131.05			
	SEM	0.09	0.02	0.04	0.04	0.07	0.09	0.10	0.10	29.36			
		p-Werte	0.36	0.50	0.98w	0.21	0.32	0.03	0.52	0.15	p-Werte	0.090	0.001 0.85w
n=13(3)	46 mM	0.07	0.03	0.10	0.18	0.39	0.52	0.55	0.44	148.26			
	SEM	0.10	0.01	0.07	0.08	0.10	0.11	0.11	0.12	39.54			
10 -7 M n=15(4)	5,75 mM	0.18	-0.05	-0.05	-0.15	-0.37	-0.51	-0.55	-0.63	139.79			
	SEM	0.05	0.05	0.02	0.05	0.09	0.11	0.11	0.06	34.12			
		p-Werte	0.002	0.45w	0.056w	0.66	0.10	0.23	0.20	0.01	p-Werte	0.990	0.057 0.886
n=26(5)	46 mM	0.06	-0.01	-0.02	-0.14	-0.45	-0.58	-0.62	-0.40	150.47			
	SEM	0.06	0.01	0.02	0.03	0.07	0.08	0.08	0.07	22.46			
10 -8 M n=15(4)	5,75 mM	0.02	-0.05	-0.11	-0.18	-0.47	-0.60	-0.59	-0.55	168.42			
	SEM	0.04	0.03	0.03	0.05	0.06	0.06	0.07	0.07	18.54			
		p-Werte	0.76	0.81w	0.78	0.71w	0.37	0.35	0.35	0.36	p-Werte	0.450	0.218 0.048
n=14(4)	46 mM	0.02	-0.03	-0.10	-0.20	-0.52	-0.65	-0.65	-0.52	181.43			
	SEM	0.02	0.01	0.02	0.07	0.10	0.10	0.12	0.09	30.23			

w = Whitney Mann Rang summen Test

SH Ratte	Inkubation				Mol/l Acetylcholin								AUC		
					1* -9	2* -9	7* -9	2* -8	7* -8	2* -7	7* -7	2* -6			
5,75 mM	1,5 h n=14(3)	Kontraktion SEM p-Werte	mN 5.30 Relaxation 0.98 SEM 0.51		0.03	-0.11	-0.31	-0.64	-0.91	-0.99	-0.99	-0.95	346.76		
					0.04	0.06	0.10	0.10	0.09	0.11	0.15	0.18	38.30		
					0.13	0.12	0.49	0.37	0.27w	0.31w	0.78w	0.91w	p-Werte	0.260	
46 mM	1,5 h n=14(3)	Kontraktion SEM	5.59 Relaxation 1.18 SEM		-0.01	-0.07	-0.28	-0.59	-0.86	-0.97	-1.02	-1.00	326.66		
					0.03	0.04	0.07	0.10	0.10	0.08	0.07	0.09	37.39		
5,75 mM	3h n=10 (3)	Kontraktion SEM p-Werte	6.18 Relaxation 1.57 SEM 0.01		-0.07	-0.21	-0.44	-0.70	-0.85	-0.93	-0.92	-0.89	365.70		
					0.05	0.08	0.14	0.14	0.11	0.10	0.08	0.06	60.16		
					0.04	0.009	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	p-Werte	0.002	
46 mM	3h n=40(10)	Kontraktion SEM	8.93 Relaxation 2.45 SEM		-0.04	-0.16	-0.37	-0.52	-0.62	-0.72	-0.74	-0.69	278.21	278.21	
					0.01	0.02	0.05	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	26.71	26.71	
5,75 mM	6h n=13(5)	Kontraktion SEM p-Werte	6.87 Relaxation 1.47 SEM 0.61		-0.01	-0.08	-0.15	-0.24	-0.28	-0.30	-0.32	-0.28	129.01		
					0.02	0.05	0.06	0.07	0.07	0.08	0.09	0.09	38.97		
					0.79	0.25w	0.24	0.73	0.89	0.88	0.52	0.56	p-Werte	0.150	
46 mM	6h n=14(5)	Kontraktion SEM	6.47 Relaxation 2.55 SEM		-0.03	-0.16	-0.22	-0.26	-0.29	-0.29	-0.39	-0.36	133.58		
					0.03	0.06	0.09	0.11	0.13	0.13	0.14	0.16	55.38		
					Mol/l Acetylcholin										
					1* -9	2* -9	7* -9	2* -8	7* -8	2* -7	7* -7	2* -6			
46 mM Moxonidin	3h n=13(4)	Kontraktion SEM p-Werte	9.93 Relaxation 1.43 SEM p-Werte		-0.06	-0.19	-0.36	-0.53	-0.65	-0.72	-0.76	-0.78	286.94		
					0.02	0.05	0.05	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	30.58		
					0.08	0.17	0.76	0.82	0.8	0.52	0.42	0.13	p-Werte	0.700	
46 mM Clonidin	3h n= 14(3)	Kontraktion SEM p-Werte	9.45 Relaxation 1.22 SEM p-Werte		-0.05	-0.18	-0.34	-0.51	-0.64	-0.70	-0.75	-0.76	277.08		
					0.02	0.05	0.07	0.09	0.10	0.10	0.10	0.11	41.96		
					0.53	0.033	0.48	0.87	0.91	0.98w	0.15w	0.1w	p-Werte	0.66	
46 mM LY333531 rein	3h n=17(3)	Substanz SEM p-Werte	Relaxation -0.19 Relaxation 0.06 SEM p-Werte		-0.11	-0.43	-0.75	-0.91	-1.02	-1.04	-1.01	-0.97	576.25		
					0.03	0.10	0.16	0.15	0.17	0.16	0.16	0.17	93.49		
					0.001	0.001	0.001	0.001	0.02	0.001	0.02	0.001	p-Werte	0.001	

w= Whitley.Mann Rangsummentest